

Dreidimensionale und effiziente Erfassung mesoskopischer Proben

Raoul-Amadeus Lorbeer, Marko Heidrich, Georgios Antonopoulos, Tammo Ripken, Heiko Meyer, Laser Zentrum Hannover e.V.

Durch die dreidimensionale Erfassung von Fluoreszenzlicht und gestreutem Licht auch in Proben die größer als einen Millimeter im Durchmesser sind, eröffnen sich in der Biologie und Medizintechnik neue Forschungsmöglichkeiten. Diese beinhalten sowohl die Untersuchung der Entwicklung von Modellorganismen wie der Fruchtfliege, dem Zebrafisch oder sogar der Maus als auch die Untersuchung pathologischer oder anatomischer Zusammenhänge in der Medizin. Hier ordnet sich die scannende laseroptische Tomographie (SLOT) ein, die speziell bei fluoreszierenden und transparenten Proben der Mesoskala, also mit mehreren Millimetern Durchmesser, ihre Anwendung findet.

1 Einleitung

In der Lichtmikroskopie geht die Untersuchung großer Proben ab einer Dicke von einem Millimeter automatisch mit einem erhöhten technischen Aufwand einher. Die typischerweise auf hohe Auflösungen ausgelegten dreidimensionalen Mikroskopieverfahren wie z.B. Konfokal- oder Multiphotonenmikroskopie sind in diesem Bereich nur bedingt anwendbar. Genauso sind die Eigenschaften besagter großer Proben im Normalfall äußerst unzulänglich für optische Untersuchungen. Im Speziellen fällt die Streuung z.B. in biologischem Gewebe zu hoch aus, um noch Licht aus entsprechenden Tiefen detektieren zu können. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten zehn Jahren vermehrt Techniken entwickelt, die biologische Proben transparent und damit optisch zugänglich machen [1-4]. Dies korreliert mit der Entwicklung optischer Technologien, die mit verfügbaren optischen Komponenten dreidimensional die Fluoreszenz

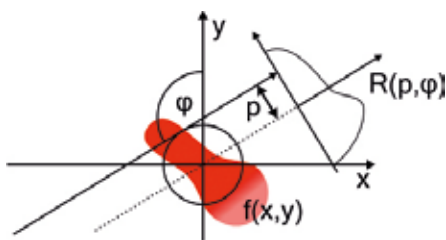


Bild 1: Grafische Darstellung der Radontransformation. Die Integrale aller $R(p,\varphi)$ entlang des Pfeils mit Abstand p vom Ursprung und dem Winkel φ mit der y-Achse, bilden die Radontransformierte der Funktion $f(x,y)$

oder auch die Streuung mesoskopischer Proben erfassen [5-10].

Im Jahr 2002 veröffentlichten James Sharpe et al. die optische Projektionstomographie (OPT) bzw. Emissions-OPT (eOPT) [6], welche mittels Fluoreszenzemission zur Untersuchung der Genexpression bei der Entwicklung von Mäuseembryonen diente. Dieser Schritt stellt den Beginn der dreidimensionalen Fluoreszenz-Erfassung an mesoskaligen Objekten dar.

OPT basiert auf der Anwendung der Computertomographie (CT) in der Optik. Hierbei ist es notwendig die Numerische Apertur (NA) des Systems stark zu reduzieren, wodurch sich allerdings eine deutliche Reduktion der Auflösung und der Sammeleffizienz gegenüber anderen lichtmikroskopischen Verfahren ergibt. Daher wurden bereits kurz nach der Anwendung der OPT Arbeiten zu Lichtblattmikroskopischen-Verfahren veröffentlicht [7,8]. Diese Verfahren bieten eine erhöhte Auflösung in lateraler Richtung gegenüber der OPT. Des Weiteren wird theoretisch alles Anregungslicht in nutzbares Fluoreszenzlicht umgesetzt und dieses dann auch effizient detektiert.

Für ansteigend große Sichtfelder fallen diese Vorteile auf Grund fehlender verfügbarer Optiken jedoch immer geringer aus. An diesem Punkt setzt die von uns entwickelte Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) an [10]. Diese hat nicht primär die Zielsetzung die Auflösung der OPT zu erhöhen, sondern sich auf die Steigerung der Detektionseffizienz zu konzentrieren.

2 Methodik

Vor jeder Aufnahme muss gewährleistet sein, dass Streuung und Absorption in der

Probe klein genug sind, um diese mit Licht durchstrahlen zu können. Hierfür muss bei biologischen Proben, nach deren Fixierung, das Wasser in der Probe meist durch eine Flüssigkeit mit einem höheren Brechungsindex ersetzt werden. Dieser Vorgang wird als „Aufklaren“ bezeichnet und wird auf unterschiedlichste Weisen umgesetzt [1-4].

2.1 Mathematische Grundlage

SLOT sowie dessen direkter Vorläufer OPT, basieren auf den physikalischen und mathematischen Prinzipien der Computertomographie.

Allen CT-Verfahren gemein ist, dass sie ein durch einen Strahl integriertes Signal erfassen. Dieser Sachverhalt wird mathematisch durch eine Radontransformation beschrieben [11].

Diese integriert über eine zweidimensionale Funktion $f(x,y)$ entlang einer Schar von Linien.

$$\text{lin}_{p,\varphi}(s) = \begin{pmatrix} p \cos \varphi - s \sin \varphi \\ p \sin \varphi + s \cos \varphi \end{pmatrix}$$

Die Linien werden durch ihren Abstand p zum Ursprung und ihren Winkel φ relativ zu der y-Achse für die gesamte Ebene definiert (**Bild 1**), s dient als Parameter, um entlang der Linie integrieren zu können. Die Gesamtheit aller integrierten Werte $R(p,\varphi)$ entlang der Linien $\text{lin}_{p,\varphi}(s)$ bilden die Radontransformierte:

$$R(p,\varphi) = \int_{-\infty}^{+\infty} ds f(p \cos \varphi - s \sin \varphi, p \sin \varphi + s \cos \varphi)$$

Der interessante Aspekt der Radontransformation liegt darin, dass es sich um eine invertierbare Funktion handelt. Mit ande-

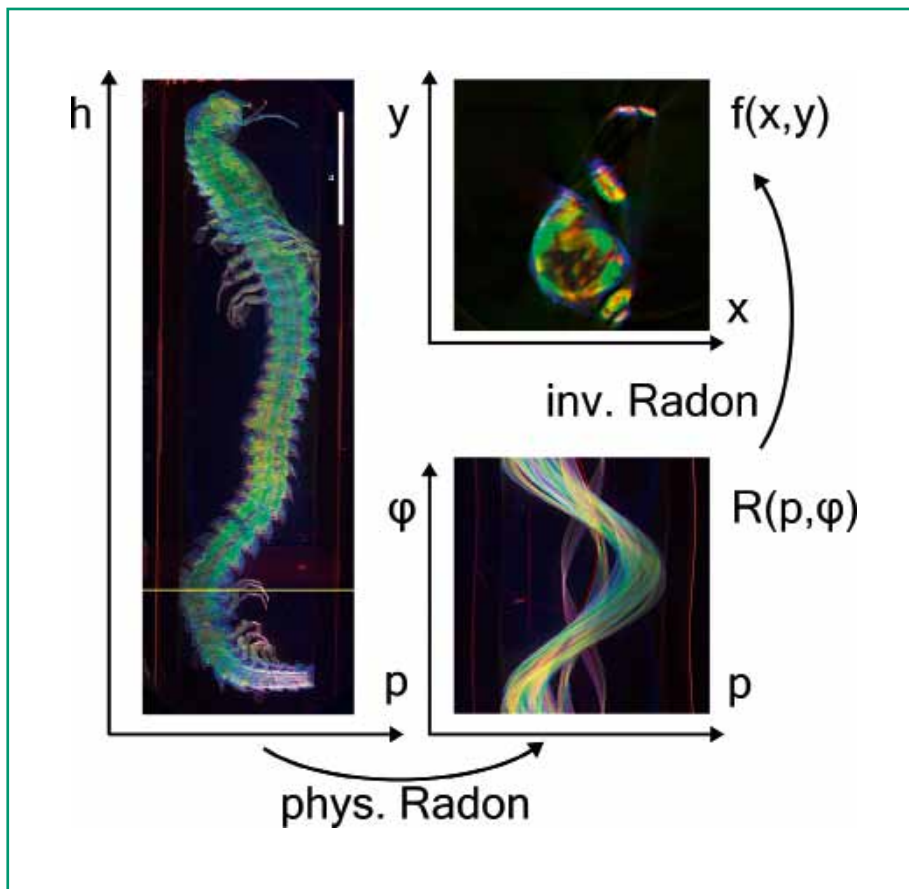


Bild 2: Aufnahme- und Rekonstruktionsablauf am Beispiel eines *Xibalbanus tulumensis*. Die gelbe Linie im linken Bild markiert eine Projektionsebene. Rechts unten ist die physikalische Radontransformation abgebildet und darüber die Rücktransformation, die zur Abbildung der Schnittebene führt. Der Skalierungsbalken beträgt 5 mm

so klein gewählt, dass die Detektionsoptik eine genügend hohe Tiefenschärfe gewährleistet, um das gesamte Objekt scharf abzubilden. Zusätzlich kann bei Positionierung der Blende in der hinteren Fokusebene der abbildenden Linse eine telezentrische Abbildung gewährleistet werden. Die telezentrische Abbildung stellt sicher, dass die Lichtstrahlen nach der Aufnahme mit den Geraden einer Radontransformation übereinstimmen. Die kleine Apertur reduziert allerdings auch die Detektions-NA und damit sowohl die Auflösung Δx als auch die Lichtsammelleffizienz E . Für eine homogene Fluoreszenzemission kann deren Abhängigkeit von der NA und dem Brechungsindex n mit folgender Formel bestimmt werden [10]:

$$E = \frac{1}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n} \right)^2} \right]$$

ren Worten: Aus der Radontransformierten $R(p,\varphi)$ lässt sich die ursprüngliche Funktion $f(x,y)$ rekonstruieren.

Bild 2 zeigt den Aufnahme- und Rekonstruktionsablauf am Beispiel eines *Xibalbanus tulumensis*. Die Farben kodieren verschiedene Kontraste. Die mit 405 nm Wellenlänge angeregte Autofluoreszenz des Panzers ist blau, die mit 532 nm Wellenlänge angeregte Autofluoreszenz der Muskulatur grün und die bei 635 nm gestreute Laserstrahlung ist rot dargestellt [15]. Zunächst werden Projektionen von dem Objekt aus verschiedenen Richtungen senkrecht zu der aufrechten Achse h gewonnen. Wird hier eine Ebene ausgewählt, entsprechen die resultierenden Daten einer physikalischen Radontransformation $R(p,\varphi)$. Diese Darstellungsform wird auch als „Sinogramm“ bezeichnet. Mit einer inversen Radontransformation kann das Sinogramm so wieder in die dazugehörige Ebene $f(x,y)$ überführt werden. Wird dies für alle Ebenen wiederholt, kann so das gesamte Volumen rekonstruiert werden.

2.2 Optischer Aufbau

Bild 3 zeigt den schematischen Aufbau eines optischen Projektionstomographen (OPT): Eine Lichtquelle wird mit einem

Diffusor homogenisiert und bei Fluoreszenzaufnahmen zusätzlich mit einem Filter in seinem Spektrum beschränkt. Mit einer Beleuchtungsapertur und einer Linse wird die Probe möglichst intensiv bei der gewünschten NA ausgeleuchtet. Die Probe befindet sich in einer Küvette, die plane Ein- und Austrittsfenster für das Licht bietet und mit Brechungsindex-anpassender Flüssigkeit gefüllt ist. Das transmittierte und emittierte Licht wird von der abbildenden Linse zusammen mit einer Detektionsapertur und einem Kameraobjektiv auf einen Kamerachip abgebildet. Bei Fluoreszenzaufnahmen ist noch ein entsprechender Detektionsfilter notwendig. Um verschiedene Blickwinkel von der Probe zu erfassen, wird diese senkrecht zur optischen Achse rotiert.

Die Blende im Detektionsstrahlengang wird

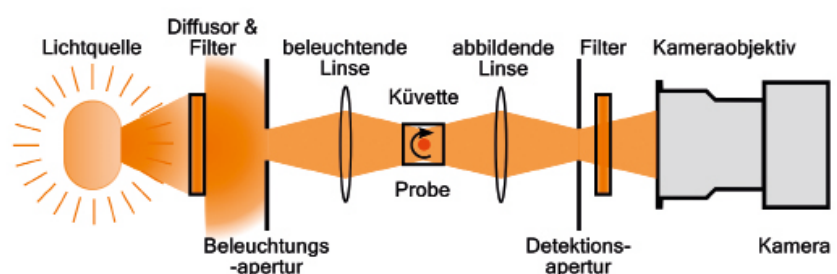


Bild 3: Schema eines optischen Projektionstomographen

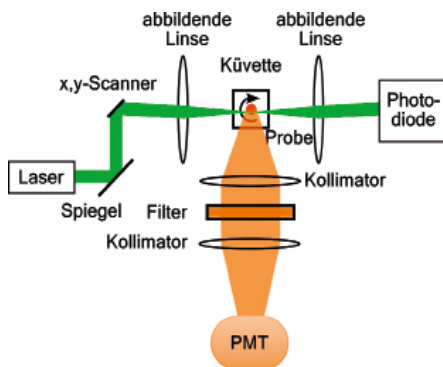


Bild 4: Schema eines scannenden laseroptischen Tomographen (SLOT)

der abbildenden Linse und einem Kollimator aufgefangen. Transmittiertes Licht wird auf einer Photodiode gesammelt, emittiertes und gestreutes Licht erreicht über den Kollimator einen PMT. Mit einem Filter ist es zusätzlich möglich das Anregungslaserlicht zu unterdrücken, was Fluoreszenzaufnahmen ermöglicht.

Durch sequenzielles Abrastern mit dem x,y-Scanner entstehen so zweidimensionale Projektionen. Um verschiedene Blickwinkel von der Probe zu erfassen, wird diese senkrecht zur optischen Achse rotiert. Das erzeugte Bild ist äquivalent zu dem eines OPT- bzw. eOPT-Aufbaus. Die Detektion kann nun allerdings von einer zweidimensionalen auf eine nulldimensionale umgestellt werden. Dies erlaubt es sowohl gestreutes als auch Fluoreszenzlicht mit einer einfachen Kollimationsoptik und mit oder ohne Fluoreszenzfilter auf einen PMT zu leiten.

3 Konsequenzen und Beispiele

Technisch ergeben sich durch den Schritt von der OPT (im speziellen der eOPT) zu SLOT einige wichtige Konsequenzen, die sich auf die Qualität der Messergebnisse auswirken. Zum einen werden Artefakte vermieden, die durch die unterschiedlichen Pixelansprechverhalten eines 2D-Sensors hervorgerufen werden. Als prominentestes Beispiel seien hierbei Ringartefakte genannt [10]. Zum anderen erhöht sich die Sammeffizienz bei Fluoreszenz- und Streulicht-Messungen drastisch gegenüber der eOPT. Hier konnte gezeigt werden, dass die Lichtsammeffizienz mit einfachen Optiken um den Faktor 300 gesteigert werden kann [10].

Dies wird auch von **Bild 5** noch einmal unterstützt. Hierbei handelt es sich um eine der ersten Aufnahmen, die mit einem SLOT erzeugt wurden. In diesem frühen Stadium wurde noch kein PMT, sondern eine Photodiode zur Detektion eingesetzt.

Dennoch war es möglich rekonstruierbare Streulichtaufnahmen zu gewinnen.

Tabelle 1 zeigt die bisher mit SLOT dargestellten Probentypen. Die bisherigen Messungen spielen sich ungefähr im Bereich zwischen $0,03 \text{ mm}^3$ bis hin zu 450 mm^3 Probenvolumen ab. Prinzipiell ist die Lichtsammeffizienz bei SLOT nahezu unabhängig von der Objektgröße. Die optische Auflösung Δx nimmt jedoch bei größeren Proben, bedingt durch die geringe Anregungs-NA, ab. In diesen Beispielen liegen die theoretischen Werte zwischen $2,5 \mu\text{m}$ und $14 \mu\text{m}$. Die theoretisch notwendige Aufnahmedauer T hingegen skaliert ungefähr mit dem Kubik der Anzahl der Messpunkte M senkrecht zur optischen Achse [14]:

$$T \propto M^3 (\Delta z) = \left(\frac{\Delta z}{\Delta x} \right)^3 = \left(\frac{8,48 n \Delta z}{\lambda} \right)^3 \propto \sqrt{V}$$

λ ist hierbei die Wellenlänge und n der Brechungsindex der Probe. Dies führt dazu, dass die Aufnahmedauer lediglich ungefähr mit der Wurzel des Messvolumens V zunimmt. Hierdurch können, so lange die Auflösung für die Fragestellung ausreicht, Studien an einer Vielzahl von Objekten durchgeführt werden ohne auf die Vorteile einer empfindlichen Messung verzichten zu müssen.

Als Beispiel sei hier auf **Bild 6** verwiesen. Hierbei handelt es sich um die mit Voreen [18] volumengerechtere Darstellung einer 3-Kanal-Messung des Unterwasserhöhlenkrebses *Xibalbanus tulumensis*. Die Gesamtaufnahmedauer dieses etwa 25 mm langen Objektes (siehe Tabelle 1) betrug ca. eine Stunde je Kanal [15]. Weiterhin war es z.B. möglich eine Gesamtzahl von 63 Heuschreckengehirnen dreidimensional zu erfassen und das bei einer Gesamtaufnahmedauer des Scan-Prozesses von nur 23 Stunden [12]. Durch moderne PC-Hardware und entsprechend angepasste Software fällt der zusätzliche Rekonstruktionsaufwand vergleichsweise gering aus.

4 Fazit

SLOT ist ein laserscannendes Mikroskopieverfahren, das mit den Prinzipien der Computertomographie dreidimensionale Aufnahmen von mesoskopischen Proben ermöglicht. Hierüber lassen sich diverse Fragestellungen aus Biologie und Medizin beantworten. Dies gilt im Speziellen bei der Nutzung von Markier- und Färbetechniken aus der Fluoreszenzmikroskopie und intrinsischen Kontrastmechanismen des Gewebes. Die Größe der Proben wird hierbei lediglich durch deren Transparenz limitiert.

Die bisherigen Applikationsfelder umfassen: Neurobiologie, Implantatforschung, Mikrobiologie der Biofilme und Anatomie von Modell- und Wasserorganismen [10,12-15]. Dabei hat SLOT gezeigt, dass immer eine hohe Detektionseffizienz gewährleistet wird und selbst bei größeren Proben die resultierende Aufnahmege-schwindigkeit ein schnelles und praktikables Arbeiten ermöglicht.

5 Danksagung

An dieser Stelle möchten wir uns bei unseren Kooperationspartnern bedanken. Zum einen Dr. Stefan Könemann, der uns den *Xibalbanus tulumensis* zur Verfügung stellte, und Christina Lorbeer aus der Arbeitsgruppe „Institut für Tierökologie und Zellbiologie - AG Zellbiologie“ von Prof. Gerd Bicker, die das Gehirn der *Locusta migratoria* präpariert und aufgeklärt hat. Weiterhin möchten wir uns bei allen Förderprogrammen bedanken, die diese Arbeiten ermöglichen. Hierzu zählen die DFG über den Exzellenzcluster „REBIRTH“, das DZL über „BREATH“, das BMWi über das Verbundprojekt „LSTM“ und das BMBF über das Verbundprojekt „TOMOSphere“.

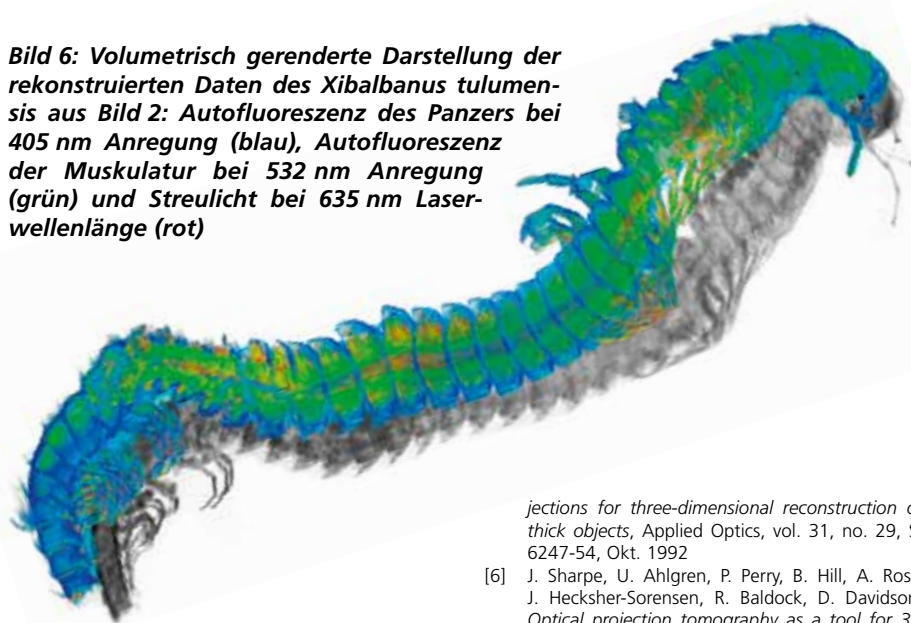


Bild 5: Rekonstruierte Streulichtaufnahme eines Heuschreckengehirns der *Locusta migratoria* und die erste vollständige Aufnahme mit SLOT-Technik. Zur Bearbeitung wurde der Gamma-wert mit ImageJ [17] angepasst und das Volumen mit einer Maximumintensitätsprojektion dargestellt. Das Bild ist ca. 1 mm breit

Probe	Maße – Abschätzung der relevanten Messvolumina				Kontrastmechanismen			
	Dicke [mm]	Höhe [mm]	Volumen [mm³]	Theoretische Auflösung (@ 532 nm) [µm]	Streulicht	Absorption & Streulicht	Fluoreszenz-färbung	Autofluoreszenz
<i>Drosophila</i> Larvengehirn [10]	0,15-0,3	0,4-0,5	0,007-0,035	2,5-3,5			X	
Heuschrecken Gehirn (<i>Locusta Migratoria</i>) [10,12]	0,3-1,6	1,2-2,4	0,08-4,8	3,5-8,2	X		X	
<i>Lobus accessorius</i> der Mäuselunge [13]	1-4	3-5	2,4-63	6,5-12,9	X		X	X
Zahn Implantate [14]	3-4	6-7	42-88	11,2-12,9		X		
Unterwasserhöhlenkrebs <i>Xibalbanus tulumensis</i> [15,16]	1,5-4,5	25-30	44-477	7,9-13,7	X			X

Tabelle 1: Bisherige SLOT-Probentypen: Maße und angewendete Kontrastmechanismen

Bild 6: Volumetrisch gerenderte Darstellung der rekonstruierten Daten des *Xibalbanus tulumensis* aus Bild 2: Autofluoreszenz des Panzers bei 405 nm Anregung (blau), Autofluoreszenz der Muskulatur bei 532 nm Anregung (grün) und Streulicht bei 635 nm Laserwellenlänge (rot)



Literaturhinweise:

- [1] W. Spalteholz, *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten Nebst Anhang: Über Knochenfärbung*, Leipzig Verlag von S. Hirzel, 1911
- [2] H.S. Sakhalkar, M. Dewhurst, T. Oliver, Y. Cao, M. Oldham, *Functional imaging in bulk tissue specimens using optical emission tomography: fluorescence preservation during optical clearing*, Physics in Medicine and Biology, vol. 52, no. 8, S. 2035-54, Apr. 2007.
- [3] H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki, *Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain*, Nat. Neurosci., vol. 14, no. 11, S. 1481-1488, Nov. 2011
- [4] K. Chung, J. Wallace, S.-Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A.S. Andalman, T.J. Davidson, J.J. Mirzabekov, K.A. Zalocusky, J. Mattis, A.K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grose, V. Gradinaru, K. Deisseroth, *Structural and molecular interrogation of intact biological systems*, Nature, vol. 497, no. 7449, S. 332-7, Mai 2013
- [5] C.S. Brown, D.H. Burns, F.A. Spelman, A.C. Nelson, *Computed tomography from optical projections for three-dimensional reconstruction of thick objects*, Applied Optics, vol. 31, no. 29, S. 6247-54, Okt. 1992

- [6] J. Sharpe, U. Ahlgren, P. Perry, B. Hill, A. Ross, J. Hecksher-Sorensen, R. Baldock, D. Davidson, *Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies*, Science, vol. 296, nr. 5567, S. 541-545, 2002
- [7] J. Huiskens, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E.H.K. Stelzer, *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*, Science (New York, N.Y.), vol. 305, nr. 5686, S. 1007-9, Aug. 2004
- [8] H. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jährling, C.P. Mauch, K. Deininger, J.M. Deussing, M. Eder, W. Ziegglängsberger, K. Becker, *Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain*, Nature methods, vol. 4, nr. 4, S. 331-6, Apr. 2007
- [9] J. Huiskens D.Y.R. Stainier, *Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology*, Development, vol. 136, nr. 12, S. 1963-1975, Juni 2009
- [10] R.-A. Lorbeer, M. Heidrich, C. Lorbeer, D.F.R. Ojeda, G. Bicker, H. Meyer, A. Heisterkamp, *Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph*, Optics Express, vol. 19, nr. 6, S. 5419-5430, März 2011
- [11] J. Radon, *Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten*. Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-Physische Klasse, 69:262-277, 1917
- [12] R. Eickhoff, R.-A. Lorbeer, H. Scheiblich, A. Heisterkamp, H. Meyer, M. Stern, G. Bicker, *Scanning Laser Optical Tomography Resolves Structural Plasticity during Regeneration in an Insect Brain*, PLoS ONE, vol. 7, nr. 7, S. e41236, Juli 2012
- [13] M. Kellner, M. Heidrich, R. Beigel, R.-A. Lorbeer, L. Knudsen, T. Ripken, A. Heisterkamp, H. Meyer, M.P. Kühnel, M. Ochs, *Imaging of the mouse lung with scanning laser optical tomography (SLOT)*, Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985), vol. 113, nr. 6, S. 975-83, Sept. 2012
- [14] M. Heidrich, M.P. Kühnel, M. Kellner, R.-A. Lorbeer, T. Lange, A. Winkel, M. Stiesch, H. Meyer, A. Heisterkamp, *3d imaging of biofilms on implants by detection of scattered light with a scanning laser optical tomograph*, Biomed. Opt. Express, 2(11):2982-2994, 2011
- [15] R.-A. Lorbeer, *Quantifizierung optischer Systeme für die optische Tomographie*, Dissertation, Fakultät für Mathematik und Physik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2012
- [16] S. Koenemann, T. Iliffe, Chapter accepted to be published 2012 in Treatise on Zoology, Vol. 5; new English edition of Traité de Zoologie; P.P. Grassé (Hrsg.), Masson: Paris, Milan, Barcelona, chapter Class Remipedia, 2012
- [17] S.R. Abramoff, P.J. Magelhaes, S.J. Ram, *Image processing with imagej*, Biophotonics International, 11(7):36-42, 2004
- [18] J. Meyer-Spradow, T. Topinski, J. Mensmann, K. Hinrichs, *Voreen: A rapid-prototyping environment for ray-casting-based volume visualizations*, IEEE Comput. Graphics Appl. 29, 6-13, 2009

Ansprechpartner:

Dr. Raoul-Amadeus Lorbeer
Laser Zentrum Hannover e.V.
Hollerithallee 8
30419 Hannover
Tel.: 0511/2788-212
Fax.: 0511/2788-100
eMail: r.lorbeer@lzh.de
Internet: www.lzh.de

