

DIGITALE BILDGEBUNG UND REKONSTRUKTION VON
LICHTBRECHENDEN PROBEN IN DEN
LEBENSWISSENSCHAFTEN

Von der Fakultät für Mathematik und Physik
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von
DIPL.-PHYS. GEORGIOS CHRISTIAN ANTONOPOULOS
geboren am 7.3.1985 in Emden

2016

Dipl.-Phys. Georgios Christian Antonopoulos:
Digitale Bildgebung und Rekonstruktion von lichtbrechenden Proben in den Lebenswissenschaften

Von der Fakultät für Mathematik und Physik
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation, Hannover, 2016

REFERENT:

Prof. Dr. Alexander Heisterkamp
Institut für Quantenoptik, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

KORREFERENT:

Prof. Dr. Holger Lubatschowski
Institut für Quantenoptik, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

EXTERNER GUTACHTER:

Prof. Dr. Peter Maaß
Zentrum für Technomathematik, Universität Bremen

TAG DER PROMOTION:

8. Juni 2016

S war in unseres Lebensweges Mitte,
Als ich mich fand in einem dunklen Walde;
Denn abgeirrt war ich vom rechten Wege,
Wohl fällt mir schwer, zu schildern diesen Wald,
Der wildverwachsen war und voller Grauen
Und in Erinn'ung schon die Furcht erneut:
So schwer, daß Tod zu leiden wenig schlimmer.
Doch um das Heil, das ich dort fand, zu künden,
Will, was ich sonst gesehen, ich berichten.

— DANTE ALIGHIERI, *Die göttliche Komödie*

Meiner Mutter gewidmet.

ABSTRACT

DIGITAL imaging generates virtual representations of biological organisms by combining physical measurements and numerical reconstruction algorithms. The scope of this thesis is the advancement of two digital imaging techniques in the life sciences, specifically Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) and digital holography.

SLOT is computed tomography with visible laser light. It generates volumetric reconstructions of biological specimens by capturing projection images of a sample from different viewing angles. To facilitate the applicability of SLOT for *in vitro* measurements, imaging of samples inside a glass capillary is to be implemented. However, refraction at the boundary surfaces of the capillary causes artifacts in the reconstructed data; these artifacts significantly hamper a quantitative analysis of the volumetric data. In this work, first the effects of light refraction on the projection data as well as the reconstructed datasets are analyzed. This is achieved by performing theoretical calculations and numerical simulations. Then, a correction algorithm is developed which permits artifact-free reconstruction. This enables the measurement and volumetric reconstruction of biological samples inside a glass capillary in SLOT; this method paves the way for establishing SLOT as a tool for *in vitro* imaging for large numbers of samples.

Another digital imaging technique that is utilized for contactless and label-free measurement of the morphology of transparent cells *in vitro* is digital holography. Its mode of operation is the quantitative reconstruction of the phase front of a light field. In this work, digital holography is used for the first time to examine the response of single cells to gold nanoparticle mediated laser perforation. Up to now, gold nanoparticle-mediated laser perforation was almost exclusively studied either on subcellular level or in tens of thousands of cells in culture dishes. The methodology presented in this work aims to bridge the gap between these two types of studies. For this purpose, a multimodal imaging and perforation setup was developed. With this, the reaction of cells after the laser perforation is analyzed and quantified using morphological and biophysical parameters. Depending on the radiant exposure and the irradiation time, the cells showed a rise in intracellular calcium as well as a decrease of phase volume. Furthermore the existence of an intercellular calcium wave, that propagated from irradiated to unirradiated cells could be shown. These observations are of great relevance to the application of gold nanoparticle mediated laser perforation in high throughput scenarios, since the observed parameters are connected to cell viability.

An essential step of the reconstruction process for digital holography is the so-called Phase Unwrapping. This is the process of removing 2π phase jumps in the calculated phase front. To this day there is a need for algorithms which enable fast reconstruction while at the same time exhibiting a high robustness to errors and inconsistencies in the measured datasets. To this end, novel tile-based phase unwrapping algorithms have been developed in this thesis. These

algorithms operate by first performing a phase unwrapping operation on rectangular subsets (tiles) of the phase map. The tiles are merged to a continuous phase map in a second step. For both steps, novel algorithms were developed. These can be combined with existing solutions in a modular fashion. The new algorithms exhibit a high degree of robustness against noise and inconsistencies in a phase map. At the same time, they are highly parallelizable due to their tile-based concept as well as an efficient use of linear algebra operations. They possess ideal prerequisites for coping with large amounts of data and thus improve the performance of digital holography for real-time imaging and process control.

Overall, in this thesis both SLOT and digital holography have been significantly advanced by improving on the respective reconstruction algorithms and unlocking new fields of application for both techniques.

Keywords: Optical Computed Tomography, Digital Holography, Inverse Problems

KURZZUSAMMENFASSUNG

DIGITALE Bildgebung ermöglicht die Darstellung von biologischen Organismen durch Kombination von physikalischen Messungen und numerischen Rekonstruktionsalgorithmen. Gegenstand dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung zweier Techniken der digitalen Bildgebung in den Lebenswissenschaften, der Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) und der digitalen Holographie.

SLOT ist Computertomographie mit sichtbarem Laserlicht. Das Ergebnis ist eine volumetrische Rekonstruktion der Probe aus Aufnahmen von Projektionen aus verschiedenen Winkeln. Um den Einsatz von SLOT in der *in vitro* Bildgebung zu vereinfachen, soll die Darstellung von Proben, die in einer Glaskapillare gehalten sind, ermöglicht werden. Lichtbrechung an den Grenzflächen der Kapillare führt zu Artefakten nach der tomographischen Rekonstruktion; diese stören die quantitative Analyse der volumetrischen Daten empfindlich. In dieser Arbeit wurden die Effekte der Lichtbrechung aufgrund der Glaskapillare auf die Projektionsdaten und die rekonstruierten Datensätze anhand von theoretischen Berechnungen und numerischen Simulationen untersucht. Daraufhin wurde ein Korrekturalgorithmus entwickelt, der eine artefaktfreie Rekonstruktion von volumetrischen Datensätzen erlaubt. Dieser ermöglicht die quantitative volumetrische Analyse von in einer Glaskapillare gehaltenen biologischen Proben mit SLOT und ebnet den Weg zur Etablierung von SLOT für die *in vitro* Bildgebung großer Probenzahlen.

Eine weitere Technik zur berührungslosen und markerfreien Messung der Morphologie transparenter Zellen *in vitro* ist die digitale Holographie. Sie erlaubt die quantitative Rekonstruktion der Phasenfront eines Lichtfeldes. Hier wurde die digitale Holographie erstmalig eingesetzt, um die Reaktion von Einzelzellen auf die Goldnanopartikel-vermittelte Laserperforation zu untersuchen. Bisher existieren fast ausschließlich zwei Arten von Studien. Dies sind einerseits Untersuchungen auf subzellulärer Ebene und andererseits Studien über die Perforation im Hochdurchsatz an Zehntausenden von Zellen. In dieser Arbeit wurde mit der Untersuchung auf Einzelzell-Ebene eine Brücke zwischen diesen Studien geschlagen. Zu diesem Zweck wurde ein multimodaler Bildgebungs- und Zellmanipulationsaufbau entwickelt. Damit wurde das Verhalten von Zellen nach der Laserperforation anhand von morphologischen und biophysikalischen Parametern untersucht. In Abhängigkeit der verwendeten Fluenz und Bestrahlungsdauer zeigten die Zellen einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels sowie einen Abfall des Phasenvolumens. Weiterhin konnte erstmalig eine zellübergreifende Calciumwelle nachgewiesen werden, die auch über nicht bestrahlte Zellen propagierte. Die beobachteten Effekte besitzen eine große Relevanz für die Anwendung der Goldnanopartikel-vermittelten Laserperforation im Hochdurchsatz, da die beobachteten Messgrößen im Zusammenhang mit der Vitalität der Zellen stehen.

Ein essentieller Schritt der Rekonstruktion in der digitalen Holographie ist das sogenannte Phase Unwrapping. Dies bezeichnet das Verstetigen von 2π Pha-

senssprüngen in der berechneten Phasenverteilung. Es besteht bis heute Bedarf an Algorithmen, die eine schnelle Rekonstruktion mit zugleich hoher Robustheit gegenüber Messfehlern ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden in der Arbeit neuartige kachelbasierte Phase Unwrapping Algorithmen entwickelt. Dabei wird das Phase Unwrapping zunächst auf einzelnen rechteckigen Unterabschnitten (Kacheln) unabhängig voneinander durchgeführt; in einem zweiten Schritt wird die komplette Phasenverteilung durch das Zusammenfügen der Kacheln verstetigt. Für beide Schritte wurden in dieser Arbeit neue Algorithmen entwickelt, die sich modular mit bestehenden Ansätzen kombinieren lassen. Die neuen Algorithmen zeichnen sich durch eine hohe Robustheit gegen Rauschen und Inkonsistenzen in der Phasenverteilung aus. Gleichzeitig sind sie durch das kachelbasierte Konzept sowie durch die effiziente Verwendung von linearer Algebra hochgradig parallelisierbar. Sie besitzen dadurch exzellente Voraussetzungen für die Bewältigung großer Datenmengen und steigern die Leistungsfähigkeit der digitalen Holographie für die Echtzeitbildgebung und Prozesskontrolle.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit sowohl SLOT als auch die digitale Holographie durch Novellierung der jeweiligen Rekonstruktionsalgorithmen maßgeblich erweitert und für beide Techniken neue Anwendungsgebiete erschlossen.

Schlagworte: Optische Computertomographie, Digitale Holographie, Inverse Probleme

INHALTSVERZEICHNIS

SYMBOLS UND ABKÜRZUNGEN	xi
1 EINLEITUNG	1
1.1 Digitale Bildgebung in den Lebenswissenschaften	1
1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	3
1.3 Vorgehensweise und Aufbau der Arbeit	6
I SCANNING LASER OPTICAL TOMOGRAPHY (SLOT)	9
2 GRUNDLAGEN	11
2.1 Ausbreitung und Brechung von Licht	11
2.2 Computertomographie und Radon-Transformation	12
2.3 Digitale Rekonstruktion durch inverse Radon-Transformation . .	14
2.4 Optische Computertomographie mit SLOT	16
3 KORREKTUR VON ARTEFAKTEN DURCH LICHTBRECHUNG IN SLOT	19
3.1 Aspekte der <i>in vitro</i> Bildgebung von Zellaggregaten mit SLOT .	19
3.2 Effekte der Lichtbrechung an einer Glaskapillare in SLOT	20
3.2.1 Theoretische und numerische Beschreibung	20
3.2.2 Numerische Simulation und Analyse von Bildartefakten .	24
3.3 Sinogramm-Entzerrung zur Korrektur von Bildartefakten	30
3.4 Validierung der Sinogramm-Entzerrung zur <i>in vitro</i> Bildgebung in SLOT	31
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels	34
II DIGITALE HOLOGRAPHIE	37
4 GRUNDLAGEN	39
4.1 Messprinzip und digitale Rekonstruktion	39
4.1.1 Prinzip der digitalen Holographie	39
4.1.2 Berechnung der Phasenverteilung mit der Fourier-Trans- formations-Methode	42
4.2 Phase Unwrapping	45
4.2.1 Mathematische Grundlagen	45
4.2.2 Klassen von Phase Unwrapping Algorithmen	48
4.2.3 Kachelbasierte Phase Unwrapping Algorithmen	49
4.2.4 Modellbasierte Phase Unwrapping Algorithmen	50
4.2.5 Spezielle Phase Unwrapping Algorithmen : SRNCP und BLS	51
4.3 Informationsgehalt der digitalen Holographie in der Zellbiolo- gie	55
5 KOMBINATION VON DIGITALER HOLOGRAPHIE UND FLUORES- ZENSBILDGEBUNG ZUR UNTERSUCHUNG DER GNP-VERMITTEL- TEN LASERPERFORATION VON ZELLEN	57
5.1 Multimodaler Perforations- und Bildgebungs Aufbau	57
5.2 Digitale Holographie und Fluoreszenzbildgebung nach der La- serperforation	59
5.2.1 Vitalität und Perforationseffizienz	59
5.2.2 Calciumsignal nach der Laserperforation	61

5.2.3	Messung des Phasenvolumens mit digitaler Holographie	63
5.3	Gegenüberstellung und Analyse der Ergebnisse	67
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels	68
6	ENTWICKLUNG UND EVALUIERUNG NEUER PHASE UNWRAPPING ALGORITHMEN	71
6.1	Entwicklung neuer Phase Unwrapping Algorithmen	71
6.1.1	Modellbasierter Kachel-Unwrapper (MLsQU)	71
6.1.2	Qualitätsgesteuerter Kachel-Merger (τ SRNCP)	73
6.2	Evaluierung und Analyse der Phase Unwrapping Algorithmen	76
6.2.1	Modellfunktion für den MLsQU Kachel-Unwrapper	77
6.2.2	Anwendung auf synthetische Phasenverteilungen mit Rauschen	77
6.2.3	Anwendung auf synthetische Phasenverteilung mit Rauschen und abgeflachten Phasensprüngen	80
6.2.4	Anwendung auf Messdaten aus der digitalen Holographie	84
6.2.5	Laufzeit und Komplexität	84
6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels	87
7	DISKUSSION UND AUSBLICK	89
7.1	Korrektur von Artefakten durch Lichtbrechung in SLOT	89
7.2	Kombinierte holographische und Fluoreszenzbildgebung	92
7.3	Entwicklung neuer Phase Unwrapping Algorithmen	95
7.4	Fazit	99
A	HERLEITUNGEN DER FORMELN ZUR LICHTBRECHUNG IN SLOT	103
	EINGESETZTE SOFTWARE	107
	LITERATURVERZEICHNIS	109
	VERÖFFENTLICHUNGEN	129
	LEBENS LAUF	133
	DANKSAGUNG	135
	ERKLÄRUNG	137

SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

Akronyme

ART	Algebraic Reconstruction Technique
ATP	Adenosintriphosphat
BLS	Block Least Squares
CCD	Charge-coupled device
CMOS	Complementary metal-oxide-semiconductor
CPU	Hauptprozessor (engl. <i>central processing unit</i>)
CS	Compressed Sensing, auch: Compressive Sampling
CT	Computertomographie
cw	Dauerstrich (engl. <i>continuous wave</i>)
DH	Digitale Holographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
FBP	Gefilterte Rückprojektion (engl. <i>filtered backprojection</i>)
GNP	Goldnanopartikel
GPU	Grafikprozessor (engl. <i>graphics processing unit</i>)
GUI	Grafische Benutzeroberfläche (engl. <i>graphical user interface</i>)
HCN	Hydrogencyanid (Blausäure)
HeNe	Helium-Neon
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol 1,4,5-Triphosphat
LED	Leuchtdiode (engl. <i>light-emitting diode</i>)
MLSQU	Modellbasierter Least Squares Kachel-Unwrapper
NA	Numerische Apertur
Nd	Neodym
OPT	Optische Projektionstomographie (engl. <i>optical projection tomography</i>)
PD	Photodiode
PMT	Photomultiplier Tube

ps	Pikosekunde
PU	Phase Unwrapping
PUA	Phase Unwrapping Algorithmus
SART	Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique
SLOT	Scanning Laser Optical Tomography
SNR	Signal-zu-Rausch Verhältnis (engl. <i>signal to noise ratio</i>)
SRNCP	Sorting by reliability following a noncontinuous path
τ SRNCP	Kachel-Merger nach dem SRNCP Prinzip
SVD	Singulärwertzerlegung (engl. <i>singular value decomposition</i>)
TV	Totale Variation
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat

Mathematische Symbole

$\delta(x - x_0)$	Delta-Distribution
δ_x, δ_y	Diskrete Ableitung in x-, bzw. y-Richtung
\mathcal{F}	Fourier-Transformation
\mathcal{F}^{-1}	Inverse Fourier-Transformation
$\Im m$	Imaginärteil einer komplexen Zahl
$\Re e$	Realteil einer komplexen Zahl
\mathcal{R}	Radon-Transformations Operator
\mathcal{W}	Wrap-Operator

Symbole zu Lichtbrechung und SLOT

c	Phasengeschwindigkeit einer Lichtwelle
c_0	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
n	Brechungsindex
n_{bad}	Brechungsindex des Bades außerhalb der Kapillare
n_{kap}	Brechungsindex der Kapillare
n_{med}	Brechungsindex des Mediums innerhalb der Kapillare
r_a	Außenradius der Glaskapillare
r_i	Innenradius der Glaskapillare
$L(\rho, \theta)$	Lichtstrahl mit Radialkoordinate ρ und Polarkoordinate θ

(ρ, θ)	Koordinaten der einfallenden Lichtstrahlen
(ρ', θ')	Koordinaten der gebrochenen Lichtstrahlen
Symbole zur digitalen Holographie und Phase Unwrapping	
\vec{a}	Vektor aus den Gradienten der Phase in einer Kachel
\vec{c}	Entwicklungskoeffizienten zu den Basisfunktionen v_l
$f(x, y)$	Modellfunktion für modellbasiertes Phase Unwrapping
$\phi_u(x, y)$	Entfaltete (engl. <i>unwrapped</i>) Phasenverteilung
$\phi_w(x, y)$	Umgebroschene (engl. <i>wrapped</i>) Phasenverteilung
$f_P(x, y)$	Polynomiale Modellfunktion mit Grad $2P$
\underline{G}	Matrix aus den Gradienten der Basisfunktionen v_l
\mathcal{J}_{AB}	Kante (engl. <i>junction</i>) zwischen zwei Kacheln τ_A, τ_B
k_{AB}	Anzahl Phasensprünge von Kachel τ_B nach Kachel τ_A
N_B	Anzahl Basisfunktionen für MLSQU Kachel-Unwrapping
N_{px}	Anzahl der Pixel einer Phasenverteilung, $N_{px} = N_x \times N_y$
N_ρ	Anzahl Schritte zur Bestimmung von ρ in Modellfunktion
\mathcal{N}_σ	Weißes gaußsches Rauschen mit Standardabweichung σ
N_τ	Gesamtzahl an Kacheln $N_\tau = N_{\tau x} \times N_{\tau y}$
$N_{\tau px}$	Anzahl Pixel innerhalb einer Kachel τ
$N_{\tau x}, N_{\tau y}$	Anzahl Kacheln in x -, bzw y -Richtung
N_x, N_y	Anzahl Pixel der Phasenverteilung in x - bzw y -Richtung
$v_l(x, y)$	Basisfunktionen des MSLQU Kachel-Unwrappers, $l = 1, \dots, N_B$
ρ	Konstanter Versatz der Modellfunktion f
$\tau_{w,h}$	Kachel (engl. <i>tile</i>) an der Position (w, h) , kurz: τ_X mit $X(w_X, h_X)$
V_{ph}	Phasenvolumen einer Zelle

EINLEITUNG

DIE digitale Technologie ist heutzutage ein wesentlicher Bestandteil der biomedizinischen Bildgebung. Sie ermöglicht nicht nur die elektronische Speicherung und Analyse von aufgenommenen Bilddaten, sondern eröffnet durch die Verwendung von numerischen Rekonstruktionsalgorithmen auch neue Wege der Bildgebung. Eine große Menge an digitalen Bildgebungstechniken wird in diversen Anwendungsfeldern einerseits als Instrument zur Bildgebung eingesetzt und andererseits beständig weiterentwickelt. Besonders Techniken, welche es ermöglichen, berührungslos und zerstörungsfrei Informationen über die dreidimensionale Gestalt von biologischen Proben zu liefern, haben dabei für die Lebenswissenschaften eine große Bedeutung erlangt [143, 179, 190, 203].

1.1 DIGITALE BILDGEBUNG IN DEN LEBENSWISSENSCHAFTEN

Eine der ersten und wohl wichtigsten Techniken zur digitalen dreidimensionalen Bildgebung ist die Computertomographie (CT). Sie basiert auf dem von Johann Radon und Allan Cormack unabhängig voneinander entwickelten mathematischen Prinzip der Rekonstruktion einer Funktion aus ihren Linienintegralen [186]. Dieses erlaubt die Rekonstruktion einer volumetrischen Verteilung anhand von Projektionen dieser Verteilung aus verschiedenen Winkeln [35, 154]; einzelne rekonstruierte Schnittbilder werden als Tomogramme bezeichnet. Diese wiederum werden zu einem volumetrischen Datensatz kombiniert. Auf Basis dieser Erkenntnisse verwirklichte Godfrey Hounsfield in den späten Sechzigerjahren die erste CT mit Röntgenlicht und demonstrierte mit James Ambrose die klinische Anwendung zur Bildgebung des Hirns [5, 89, 90]. Die CT hat schnell und tiefgreifend die medizinische Bildgebung revolutioniert. Dies findet auch Ausdruck in der Tatsache, dass Cormack und Hounsfield nur acht Jahre nach der Konstruktion des ersten Computertomographen der Nobelpreis in Medizin verliehen wurde [90]. In den folgenden Jahrzehnten wurde das Prinzip der CT auch mit sichtbarem Licht [111], Infrarot- [42], Terahertz- [74] und Mikrowellenstrahlung [21] sowie Elektronenstrahlen [59] und Neutronenquellen [118] umgesetzt, um nur einige Beispiele zu nennen. Diese Techniken decken viele Anwendungsfelder weit über die Lebenswissenschaften hinaus ab. Für jede Variante ergeben sich einzigartige Herausforderungen sowohl bezüglich der technischen Umsetzung als auch der digitalen Rekonstruktionsalgorithmen. Gleichzeitig besteht ein erhebliches Synergiepotential, da das grundlegende Prinzip allen Techniken gemein ist.

In den Lebenswissenschaften ist nicht nur die CT mit Röntgenstrahlung, sondern auch mit sichtbarem Licht von Interesse [23, 169]. Sie fand ihre erste Umsetzung für mikroskopische biologische Proben durch Kawata *et al.* im Jahr 1985 [111, 110, 140] und wurde von Brown *et al.* 1992 auch für die Bildgebung mesoskopischer Proben eingesetzt [23]. Im Jahr 2002 veröffentlichten und

patentierten Sharpe *et al.* [171], denen die Arbeiten von Kawata und Brown unbekannt waren, ihr System zur optischen Computertomographie und benannten es optische Projektionstomographie (OPT). Besonders in der Entwicklungsbiologie findet diese Technik Anwendung für die Untersuchung von biologischen Modellorganismen mit Abmessungen von wenigen hundert Mikrometern bis zu mehreren Millimetern [53, 152]. Da sichtbares Licht zur Beleuchtung der Probe verwendet wird, können die aus der optischen Mikroskopie bekannten Kontrastmechanismen, wie z.B. Fluoreszenz und Fluoreszenzlebenszeit, sowohl mit als auch ohne Markier- und Färbetechniken genutzt werden [133, 152, 171, 170]. Um auch Proben im Millimeterbereich transparent zu machen, wird auf eine Fülle von optischen Aufklarungsverfahren zurückgegriffen, welche auch in konkurrierenden dreidimensionalen Mikroskopietechniken eingesetzt werden [9, 33, 51, 77, 113, 189]. Neben dem Einsatz von OPT zur *ex vivo* Bildgebung [50, 112, 152, 170], wurde auch die Anwendung zur *in vitro* und *in vivo* Bildgebung biologischer Modellorganismen demonstriert [13, 135, 158]. In der OPT wird eine Projektion durch eine telezentrische Abbildung mit einer Tiefenschärfe proportional zur Ausdehnung der Probe realisiert [171]. Dadurch wird allerdings die numerische Apertur und damit die Lichtsammelfizienz der Detektion beschränkt. Durch ein rasterndes Beleuchtungsprinzip wird dieser Nachteil in der Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) überwunden [126]. SLOT wurde am Laser Zentrum Hannover e.V. entwickelt und von Lorbeer *et al.* im Jahr 2011 vorgestellt [128]. In SLOT können die gleichen Kontrastmechanismen wie in der OPT genutzt werden [82, 127, 200]. Weiterhin wurde bereits die erfolgreiche Anwendung von SLOT in der Neurobiologie, der Implantatforschung und der Anatomie demonstriert [50, 83, 112, 113].

Für die CT mit Röntgenstrahlung hat die Lichtbrechung und Beugung in vielen Anwendungsfällen in der Regel keine Bedeutung. Grund dafür ist, dass der Brechungsindex für Röntgenlicht von praktisch allen Materialien gleich und nahe eins ist [45, 175]. Im sichtbaren Spektralbereich gilt dies nicht mehr, sodass Lichtbrechung hier ein alltägliches Phänomen ist. Beim Übergang zwischen verschiedenen Materialien ändert Licht seine Ausbreitungsgeschwindigkeit und -richtung aufgrund von Brechungsindexunterschieden. In OPT und SLOT werden üblicherweise optisch aufgeklärte Proben verwendet, die in einem Bad mit angepasstem Brechungsindex gehaltert werden [152, 171]. Wenn allerdings Brechungsindexunterschiede verbleiben, dann entstehen Artefakte in den rekonstruierten Schnittbildern. Diese Artefakte sind dadurch begründet, dass die Lichtbrechung im Rekonstruktionsalgorithmus nicht berücksichtigt wird. Die Artefakte verhindern die quantitative Auswertung der rekonstruierten volumetrischen Datensätze. Die Untersuchung von SLOT in Gegenwart von Lichtbrechung und die Weiterentwicklung der digitalen Rekonstruktionsalgorithmen zur artefaktfreien Rekonstruktion trotz Lichtbrechung sind Schwerpunkte dieser Arbeit.

Während die Lichtbrechung bei SLOT zu unerwünschten Artefakten führt, ist sie bei der digitalen Holographie ein grundlegender Bestandteil des Messprinzips. Die digitale Holographie ist ein Verfahren zur digitalen Bildgebung lichtbrechender Proben. Sie erlaubt es, aus Messungen der Amplitude einer Wellenfront sowohl Informationen über die Amplituden- als auch Phasenverteilung

dieser Wellenfront zu rekonstruieren. Das Grundprinzip der Holographie wurde von Dennis Gabor im Jahr 1948 beschrieben; 1971 wurde er dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [63, 62]. Bereits 1967 wurde durch Joseph Goodman die erste digitale holographische Messung und Rekonstruktion demonstriert [70]. Allerdings fand die digitale Holographie erst um die Jahrtausendwende durch die Verfügbarkeit von erschwinglichen Digitalkamerachips und hinreichend leistungsfähigen Computern eine breitere Anwendung [37, 117, 162]. Seitdem hat die digitale Holographie auch in den Lebenswissenschaften, insbesondere in der Zellbiologie, zunehmend Anwendung gefunden [55, 167]. Dort wird sie vor allem als Technik zur quantitativen Phasenbildgebung eingesetzt [167].

Der Bildgebung von tierischen oder menschlichen Zellen kommt in den Lebenswissenschaften eine fundamentale Bedeutung zu. Allerdings sind einzelne Zellen nahezu transparent, sodass sie in der Durchlichtmikroskopie kaum Helligkeitskontrast erzeugen [167]. Daher werden häufig Verfahren wie die Phasenkontrast- oder die differentielle Interferenzkontrast-Mikroskopie zur Bildgebung von diesen Zellen eingesetzt [167, 139]. Dabei entsteht ein Bildkontrast aufgrund eines Gangunterschiedes, den das Licht beim Durchgang durch die Zelle relativ zum umgebenden Medium erfährt [139]. Aus diesen Bildern können allerdings keine quantitativen Informationen über die Phase der Wellenfront und damit die Größe des Gangunterschiedes gewonnen werden [167, 38]. Allerdings konnte bereits im Jahr 1952 gezeigt werden, dass mit der Messung des Gangunterschiedes quantitative Aussagen bezüglich der Morphologie und des Proteingehaltes einer Zelle ermöglicht werden [11, 40, 167]. Die damaligen Verfahren waren jedoch mit einem erheblichen experimentellen Aufwand verbunden, sodass sie weitestgehend unbeachtet blieben [167]. Hier setzt die digitale Holographie als Technik zur quantitativen Phasenbildgebung in den Lebenswissenschaften an. Heutzutage findet sie in der Zellbiologie vielfältige Verwendung, da sie mit geringem Aufwand eine markerfreie, quantitative Messung von Phaseninformationen mit hoher Sensitivität und in Echtzeit ermöglicht [145, 167, 55]. Oft wird sie als markerfreie Methode in Kombination mit anderen Bildgebungstechniken, vor allem der Fluoreszenzbildgebung, eingesetzt [55, 148]. Für eukaryotische Zellen wird sie unter anderem zur Analyse des Zellwachstums [150] und der Zellteilung [155] über viele Stunden, teils sogar in Mischkulturen [116], eingesetzt. Der Einsatz der digitalen Holographie in den Lebenswissenschaften und die Weiterentwicklung der Rekonstruktionsalgorithmen stellen weitere Schwerpunkte dieser Arbeit dar.

Sowohl SLOT als auch die digitale Holographie sind somit digitale Bildgebungstechniken mit einem großen Potential in den Lebenswissenschaften. Beide werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht und weiterentwickelt. Die Fragestellungen, an denen diese Arbeit ansetzt und die Ziele, die in der Arbeit verfolgt werden, sind im nächsten Abschnitt dargestellt.

1.2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Diese Arbeit befasst sich mit zwei Techniken der digitalen Bildgebung: der Scanning Laser Optical Tomography und der digitalen Holographie. Über bei-

de Teilgebiete hinweg wird in dieser Arbeit ein übergeordnetes Ziel verfolgt: Durch Erweiterung und Verbesserung der jeweiligen Rekonstruktionsalgorithmen sollen für beide Techniken die Grundsteine zur Erschließung neuer Anwendungsbereiche gelegt werden. In diesem Zusammenhang soll die enorme Leistungsfähigkeit digitaler Bildgebung in den Lebenswissenschaften demonstriert werden, die sich erst aus der Verbindung von physikalischen Messgrößen und digitalen Rekonstruktionsalgorithmen ergibt. Aus jenem übergeordneten Ziel leiten sich konkrete Teilziele ab, die im Folgenden einzeln motiviert und vorgestellt werden.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit SLOT, d.h. mit Computertomographie mit sichtbarem Laserlicht. Das wohl wichtigste Alleinstellungsmerkmal von SLOT gegenüber der OPT stellt die bis zu zwei Größenordnungen höhere Sammeleffizienz dar [128]. So kann die Beleuchtung derart abgeschwächt werden, dass die Phototoxizität von SLOT gegenüber der OPT signifikant verringert ist [127]. Daraus ergibt sich ein hohes Potential für den Einsatz von SLOT zur schonenden *in vitro* Bildgebung biologischer Proben. Jener Sachverhalt wurde von Heidrich *et al.* zur Bildgebung von Biofilmen auf intransparenten Oberflächen genutzt [83]. Dies blieb jedoch vorerst die einzige Veröffentlichung zur *in vitro* Bildgebung mit SLOT und die weitere Forschung konzentrierte sich auf den Einsatz von SLOT zur Bildgebung optisch aufgeklärter Proben und auf die Entwicklung neuer Technologien zur optischen Aufklärung [20, 83, 50, 82, 112, 113, 128, 137]. Bei der optischen Aufklärung wird das Gewebswasser der Probe oft durch ein Immersionsfluid ersetzt, dessen Brechungsindex den festen Gewebebestandteilen (Fasern, Zellkompartimenten, etc.) der Probe angepasst ist [9, 33, 51, 78, 189]. Durch optische Aufklärung wird die Streuung von Licht innerhalb der Probe stark reduziert, sodass die Eindringtiefe drastisch ansteigt. Auch eine Richtungsänderung der Strahlen durch Lichtbrechung in der Probe wird unterdrückt, indem das Immersionsfluid als Bad für die Probe verwendet wird. Für die *in vitro* Bildgebung ist optische Aufklärung üblicherweise nicht einsetzbar, da die Proben möglichst lebend und unter physiologischen Bedingungen gemessen werden sollen. Die Herausforderungen für den Einsatz von SLOT zur *in vitro* Bildgebung biologischer Proben ergeben sich nicht zuletzt aus der Notwendigkeit, die Proben steril zu halten und gleichzeitig die Aufnahme von Projektionsbildern aus verschiedenen Winkeln zu ermöglichen. Hier setzt diese Arbeit mit der Verwendung von versiegelbaren Glaskapillaren als praktikables Halterungskonzept an, das sich in anderen Bildgebungstechniken bereits bewährt hat [17, 142]. Die Proben werden innerhalb der Glaskapillare in einem angepassten Nährmedium gelagert. In dieser Arbeit sollen Zellaggregate aus humanen Stammzellen als biologische Proben verwendet werden. Diese stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Generation von Stammzellen in großen Mengen für therapeutische Zwecke in der regenerativen Medizin dar [143, 204]. An dieser Stelle wird festgehalten:

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung von SLOT dahingehend voranzutreiben, dass das Potential zur in vitro Bildgebung biologischer Proben für breite Anwendungsfelder zugänglich wird.

Für die *in vitro* Bildgebung müssen nicht nur Zellaggregate, sondern auch viele andere biologische Proben während der Messung in einem Nährmedium gehalten werden. Durch einen Brechungsindexunterschied von Glaskapillare und Kulturmedium kommt es an den Grenzflächen der Glaskapillare zur Lichtbrechung. Diese wiederum führt zu Artefakten in den rekonstruierten Datensätzen. Artefakte sind Fehler in den rekonstruierten Datensätzen, die nicht den tatsächlichen Eigenschaften der Probe entsprechen, sondern auf Unzulänglichkeiten der Rekonstruktionsalgorithmen beruhen. Um die Glaskapillare als Halterung in der Praxis nutzen zu können, müssen diese Artefakte zunächst untersucht werden. Anschließend soll die digitale Rekonstruktion der Daten dahingehend ausgebaut werden, dass diese Artefakte korrigiert werden und so eine artefaktfreie volumetrische Rekonstruktion der Messdaten möglich wird.

Daher ist ein zweites Ziel dieser Arbeit, die digitale Rekonstruktion dahingehend zu erweitern, dass SLOT auch in Gegenwart von Lichtbrechung durch Glaskapillaren erfolgreich genutzt werden kann.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der digitalen Holographie. Die digitale Holographie bietet die Möglichkeit, berührungslos und in Echtzeit, Informationen über die Morphologie von Zellen zu gewinnen [145]. Damit ist sie besonders zur multimodalen Bildgebung in Kombination mit der Fluoreszenzbildgebung für die Untersuchung dynamischer zellulärer Prozesse von Interesse [55, 147]. In dieser Arbeit soll die multimodale Bildgebung erstmalig zur Untersuchung der Goldnanopartikel (GNP)-vermittelten Laserperforation eingesetzt werden. Die GNP-vermittelte Laserperforation findet insbesondere zur Zelltransfektion Anwendung, d.h. zum Einbringen von funktionellen Molekülen in Zellen [14, 164]. Dabei wird die Wechselwirkung eines schwach fokussierten Laserstrahls mit Goldnanopartikeln, mit denen die Zellen beladen werden, ausgenutzt, um eine vorübergehende Öffnung der Zellmembran zu erreichen [84, 85]. Es existiert eine Vielzahl von Studien, in denen die Vitalität der Zellen und die Perforationseffizienz für verschiedene Arten von Molekülen und Nanopartikel-Strukturen untersucht wurden [15, 84, 85, 105, 107, 106, 104, 165]. Die Reaktion der Zelle anhand von biophysikalischen Parametern ist bisher jedoch kaum im Detail untersucht worden, sodass die vorliegende Arbeit genau an dieser Stelle ansetzt. Anhand der Untersuchung von Zellen mit der multimodalen Bildgebung soll ein erweitertes Verständnis der Mechanismen der GNP-vermittelten Laserperforation auf zellulärer Ebene generiert werden.

Ein dritter Aspekt dieser Arbeit ist also die Entwicklung und Implementierung eines experimentellen Aufbaus, der die Untersuchung der Reaktion von einzelnen Zellen auf die GNP-vermittelte Laserperforation mittels digitaler Holographie und Fluoreszenzbildgebung ermöglicht.

Viele Umsetzungen der digitalen Holographie benötigen einen sogenannten Phase Unwrapping Algorithmus zur digitalen Rekonstruktion der Messdaten [167, 117]. Phase Unwrapping Algorithmen leisten die Verstetigung der Messdaten zu einer zusammenhängenden Phasenverteilung und sind seit mehreren Jahrzehnten ein eigenständiges Forschungsfeld der angewandten Mathematik geworden, in welchem sich bis heute neue Lösungsansätze ergeben

[10, 12, 188]. Lokale Fehler und Inkonsistenzen in den interferometrischen Messdaten können die Algorithmen sehr empfindlich beeinflussen und zu fehlerhaften Resultaten führen [87, 182]. Es besteht somit insbesondere Bedarf an Algorithmen, die eine hohe Robustheit gegenüber Fehlern in den Messdaten aufweisen. Gleichzeitig müssen diese eine effiziente Implementierung zulassen, sodass eine Prozessierung von großen Mengen an Messdaten möglich wird [149].

Als viertes Ziel wird somit die Entwicklung und Implementierung neuer Phase Unwrapping Algorithmen verfolgt, die eine hohe Robustheit gegenüber Fehlern in den Messdaten aufweisen und gleichzeitig eine effiziente numerische Implementierung zulassen.

Aufgrund der bestehenden Vielfalt an Literatur zum Phase Unwrapping müssen die neu entwickelten Algorithmen mit bestehenden Lösungsansätzen verglichen werden. Dazu soll ein modulares Programm geschaffen werden, welches die Implementierungen von verschiedenen Phase Unwrapping Algorithmen durch ein modulares Konzept vereinfacht. Dieses Programm soll auch den quantitativen Vergleich verschiedener Algorithmen ermöglichen. Darüber hinaus sollte es so gestaltet werden, dass es die Entwicklung neuer Algorithmen begünstigt. Zu diesem Zweck sollte es anschließend als freie Software veröffentlicht werden, um auch als Ausgangspunkt für die Ideen weiterer Forscher zu dienen.

Die fünfte Zielsetzung dieser Arbeit ist somit die Schaffung eines modularen Programms zum Phase Unwrapping, welches die Entwicklung und Implementierung neuer Algorithmen und den Vergleich mit bestehenden Lösungsansätzen ermöglicht.

Hiermit sind die Ziele der vorliegenden Arbeit definiert. Im anschließenden Abschnitt wird die Vorgehensweise dargestellt, welche zur Erreichung dieser Ziele verfolgt wurde.

1.3 VORGEHENSWEISE UND AUFBAU DER ARBEIT

Diese Dissertation ist in zwei Teile unterteilt, deren ersten die Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) darstellt, den anderen die digitale Holographie. Zum Abschluss werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert und bezüglich der übergeordneten Zielsetzung bewertet.

In Teil I werden zuerst die Arbeiten zur Bildgebung mit SLOT in Gegenwart von Lichtbrechung vorgestellt. Beginnend mit dem Kapitel 2 werden zunächst die Grundlagen behandelt, die zum Verständnis des Problems und der hier entwickelten Lösung notwendig sind. Dieser Abschnitt legt nicht nur das Fundament für das Verständnis der Lichtbrechung in SLOT, sondern auch in der digitalen Holographie. Anschließend werden die Grundprinzipien der CT und der Rekonstruktion von Projektionsdaten zu volumetrischen Datensätzen erläutert. Abschließend werden der Aufbau und die Prinzipien von SLOT vorgestellt.

Die Themen des Kapitels 3 sind die Untersuchung und Korrektur von Artefakten aufgrund von Lichtbrechung für Proben innerhalb einer Glaskapillare in SLOT. Die Effekte der Lichtbrechung an der Glaskapillare für die mit SLOT

generierten Projektionsdaten werden zunächst anhand von theoretischen Berechnungen und numerischen Simulationen untersucht. Auf Basis dieser Erkenntnisse wird ein Algorithmus – die Sinogramm-Entzerrung – entwickelt, der eine artefaktfreie Rekonstruktion ermöglicht. Anhand von Messdaten wird die erfolgreiche Anwendung der Sinogramm-Entzerrung für die *in vitro* Bildgebung von Stammzell-Aggregaten demonstriert.

Teil II dieser Arbeit befasst sich mit der digitalen Holographie und stellt sowohl eine Anwendung der Technik als auch die Entwicklung neuer Algorithmen zur digitalen Rekonstruktion vor. In Kapitel 4 werden die Grundlagen der digitalen Holographie und der digitalen Rekonstruktion, insbesondere des Phase Unwrappings, vorgestellt. Darin werden auch die Anwendung und die Bedeutung der digitalen Holographie für die Zellbiologie besprochen.

In Kapitel 5 wird die Anwendung der digitalen Holographie zur Untersuchung der Reaktion von Zellen auf die Goldnanopartikel-vermittelte Laserperforation behandelt. Dazu wird zunächst ein im Rahmen dieser Arbeit entwickelter experimenteller Aufbau beschrieben, der die Perforation und anschließende Untersuchung von Zellen mit Fluoreszenzbildgebung und digitaler Holographie ermöglicht. Daraufhin wird eine umfangreiche Studie vorgestellt, in der neben der Vitalität und Perforationseffizienz auch biophysikalische und morphologische Eigenschaften der Zellen nach der Perforation gemessen wurden. Die Ergebnisse der verschiedenen Bildgebungsmodalitäten werden zunächst einzeln präsentiert und dann gegenübergestellt sowie analysiert.

Das Kapitel 6 ist das letzte Ergebniskapitel und stellt die Entwicklung und Implementierung neuer Phase Unwrapping Algorithmen vor. Bestehende Konzepte wurden mit bis dahin nicht verwendeten Lösungsansätzen kombiniert, um neue Phase Unwrapping Algorithmen zu schaffen. Diese wurden in ein modulares Programm implementiert und werden zu Beginn des Kapitels erläutert. Die in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen wurden getestet und mit bestehenden Algorithmen verglichen. Dabei wurde die hohe Robustheit der neuen Algorithmen gegen Rauschen und Fehler an synthetischen und realen Datensätzen demonstriert. Abschließend werden die Algorithmen bezüglich ihrer Laufzeitkomplexität analysiert.

Im siebten und letzten Kapitel werden die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate im Hinblick auf die Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit diskutiert. Dazu werden die Ergebnisse zunächst kapitelweise besprochen. Begonnen wird in Abschnitt 7.1 mit den Ergebnissen zur Untersuchung und Korrektur der Lichtbrechung an einer Glaskapillare in SLOT. Dabei wird die Bedeutung der Sinogramm-Entzerrung für die digitale Datenverarbeitung in SLOT analysiert und für die *in vitro* Bildgebung mit SLOT diskutiert. Abschließend wird ein Ausblick zur Erweiterung auf beliebige Geometrien von lichtbrechenden Oberflächen gegeben. Danach werden in Abschnitt 7.2 die Arbeiten zur Untersuchung der Goldnanopartikel-vermittelten Zellperforation mittels kombinierter digital holographischer und Fluoreszenzbildgebung besprochen. Es wird die Bedeutung der Messergebnisse und der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik für das Verfahren der GNP-vermittelten Laserperforation diskutiert. Daraus ergeben sich neue Fragestellungen, für die ein Ausblick auf nachfolgende experimentelle Untersuchungen gegeben wird. In Abschnitt 7.3 werden die neu entwickelten Phase Unwrapping Algorithmen bewertet. Es

findet in diesem Zusammenhang auch eine Einordnung in die Landschaft der bestehenden Algorithmen statt und es werden Anwendungsfelder identifiziert, für welche die neu entwickelten Algorithmen besonders geeignet sind. Zuletzt wird ein Ausblick zur Weiterentwicklung der Algorithmen gegeben.

Das Diskussionskapitel beendet die vorliegende Arbeit in Abschnitt 7.4 mit einem Fazit, in welchem eine Bewertung der Ergebnisse anhand der Ziele dieser Arbeit erfolgt. Hier werden auch beide Teile zusammen im Hinblick auf die übergeordnete Zielsetzung dieser Arbeit besprochen.

Teil I

SCANNING LASER OPTICAL TOMOGRAPHY (SLOT)

DIESES Kapitel stellt die Grundlagen vor, die zum Verständnis der Lichtbrechung und der optischen Computertomographie nötig sind. Die Wissensinhalte sind Aufsätzen und Lehrbüchern entnommen, die an entsprechender Stelle zitiert werden. In Abschnitt 2.1 wird zunächst in die Theorie zur Lichtausbreitung und Brechung eingeführt. Anschließend werden in Abschnitt 2.2 die Prinzipien der Computertomographie behandelt und die Bildentstehung von Projektionsdatensätzen mathematisch anhand der Radon-Transformation beschrieben. Daraufhin werden in Abschnitt 2.3 die fundamentalen mathematischen Konzepte und numerischen Algorithmen zur digitalen Rekonstruktion von volumetrischen Datensätzen vorgestellt. Das Kapitel schließt in Abschnitt 2.4 mit der Beschreibung der Funktionsweise von SLOT und stellt den Zusammenhang zur optischen Computertomographie her.

2.1 AUSBREITUNG UND BRECHUNG VON LICHT

Aufbauend auf den Maxwell'schen Gleichungen wird die Theorie zur Ausbreitung von Licht im Folgenden knapp wiedergegeben. Insbesondere werden die Lichtbrechung und die Grundlagen der geometrischen Optik erläutert. Darüber hinaus werden die Phase einer Lichtwelle und der Begriff der Wellenfront eingeführt, die auch für die digitale Holographie eine wesentliche Rolle spielen. Die Darstellung orientiert sich vorrangig an [43] und [176].

Aus den Maxwell'schen Gleichungen folgt die elektromagnetische Wellengleichung

$$(\nabla^2 - 1/c^2 \cdot \partial^2/\partial t^2) \vec{E}(\vec{x}, t) = \vec{0} \quad (2.1)$$

zur Beschreibung der Lichtausbreitung in dielektrischen Medien. Dabei ist $\vec{E}(\vec{x}, t)$ der Vektor der elektrischen Feldstärke in Abhängigkeit des Ortes \vec{x} und der Zeit t . Weiterhin ist c die Phasengeschwindigkeit der elektromagnetischen Welle im Dielektrikum. Diese ist der Quotient der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum c_0 und des Brechungsindex n des Mediums:

$$c = \frac{c_0}{n}, \quad n = \sqrt{\epsilon_r \cdot \mu_r}. \quad (2.2)$$

Der Brechungsindex eines Materials ergibt sich aus den relativen elektrischen und magnetischen Permeabilitäten des Materials ϵ_r , bzw. μ_r . Im Allgemeinen ist die Brechungsindexverteilung eines inhomogenen Mediums ortsabhängig, sodass $n = n(\vec{x})$ gilt [43]. Eine Abhängigkeit des Brechungsindex von der Wellenlänge wird in der Schreibweise vernachlässigt, da in dieser Arbeit nur monochromatisches Licht betrachtet wird. Gleichung 2.2 besagt, dass sich die Phasengeschwindigkeit einer Lichtwelle beim Durchlaufen eines Mediums mit inhomogener Brechungsindexverteilung ändert. Damit geht auch eine Richtungsänderung einher, wie unten geschildert wird. Zuvor sollen kurz

*Brechungsindex und
Phasengeschwindigkeit*

die Grundlagen der Lichtausbreitung und der geometrischen Optik eingeführt werden.

*Propagation von
Wellenfronten*

Die Polarisation liefert in der optischen Computertomographie keinen relevanten Kontrastmechanismus [127]. Aus diesem Grund wird die elektrische Feldstärke fortan als skalare Größe $E(\vec{x}, t)$ geschrieben. Für ein monochromatisches elektrisches Feld kann ganz allgemein

$$E(\vec{x}, t) = A(\vec{x}) \cdot e^{i\phi(\vec{x})} \cdot e^{-i\omega t} \quad (2.3)$$

angesetzt werden. Dabei ist $A(\vec{x}) \in \mathbb{R}$ die Amplituden-, d.h. die Helligkeitsverteilung, $\phi(\vec{x}) \in \mathbb{R}$ die räumliche Phasenverteilung und $\omega = 2\pi \cdot c/\lambda \in \mathbb{R}$ die Kreisfrequenz der elektromagnetischen Welle. Zusätzlich wird vorausgesetzt, dass die räumliche Änderung der Amplituden- und Phasenverteilung langsam gegenüber der Variation des Brechungsindex des Mediums erfolgt. Die Flächen gleicher Phase, d.h. alle Punkte mit $\phi(\vec{x}) = \text{const.}$, werden als *Wellenfronten* oder *Phasenfronten* der elektromagnetischen Welle bezeichnet. Einsetzen von Gleichung 2.3 in Gleichung 2.1 ergibt dann nach einigen Umformungen [176]:

$$\left(\frac{c_0}{\omega} \cdot \nabla\phi(\vec{x})\right)^2 = n^2(\vec{x}). \quad (2.4)$$

*Geometrische Optik und
Lichtstrahlen*

Die Propagation einer Wellenfront durch ein inhomogenes Medium führt zu einer Deformation der Wellenfront gegenüber dem Ausgangszustand. Die räumliche Entwicklung der Wellenfront ist vollständig durch die Brechungsindexverteilung des Mediums bestimmt. Die Vektoren, welche senkrecht auf den Wellenfronten stehen, werden als *Lichtstrahlen* bezeichnet [43]. Die räumlichen Verläufe dieser Vektoren sind durch Gleichung 2.4 gegeben. Die physikalische Bedeutung der Lichtstrahlen ergibt sich dadurch, dass sie stets in Richtung des Energieflusses des elektromagnetischen Feldes zeigen [72].

Die Beschreibung des Verlaufes von Licht als Bündel von Strahlen ist die Grundlage der geometrischen Optik. Im Rahmen der geometrischen Optik lassen sich sowohl die Lichtbrechung als auch die Verformung von Wellenfronten beim Durchgang durch inhomogene Medien beschreiben. Dieser Formalismus reicht also für das Verständnis der weiteren Abschnitte dieser Arbeit aus. Insbesondere kann für die Brechung von Lichtstrahlen an Grenzflächen zweier homogener Medien gezeigt werden [43, 194]:

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2, \quad (2.5)$$

wobei n_1 und n_2 die Brechungsindices der Medien sind und θ_1 und θ_2 die Winkel zwischen den Lichtstrahlen und den Flächennormalen der Grenzflächen der Medien darstellen. Die Flächennormalen zeigen dabei jeweils in das Innere des zugehörigen Mediums. Dieser Zusammenhang ist als das Snellius'sche Brechungsgesetz bekannt.

2.2 COMPUTERTOMOGRAPHIE UND RADON-TRANSFORMATION

Das Prinzip der Computertomographie ist die digitale Rekonstruktion des Inneren einer Probe aus einer Serie von Projektionen, d.h. Durchleuchtungen, aus verschiedenen Winkeln. Für die Durchleuchtung einer Probe mit Licht

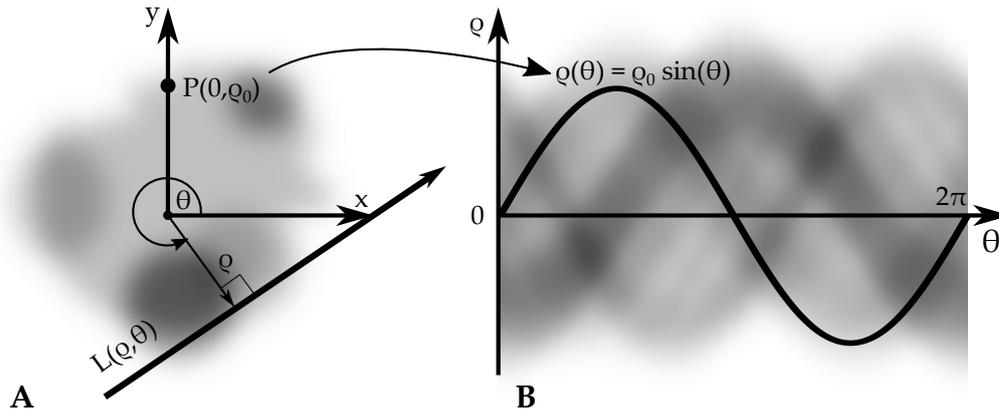


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer zweidimensionalen Verteilung und ihrer Radon-Transformation. **A** Die Verteilung im räumlichen Koordinatensystem. Die Radon-Transformation integriert die Verteilung entlang von Linien $L(\rho, \theta)$. Diese werden anhand ihres Abstands zum Ursprung ρ und ihres Polarwinkels θ parametrisiert. **B** Die Radon-Transformierte der Verteilung, auch *Sinogramm* genannt. Jeder Punkt im Ortsraum trägt entlang einer sinusförmigen Trajektorie im Sinogramm bei. Die Amplitude und Phase der Sinuskurve werden von der Lage des Punktes im Ortsraum bestimmt. Die Korrespondenz ist hier beispielhaft dargestellt für einen Punkt P auf der y -Achse und die entsprechende Trajektorie im Sinogramm.

existieren drei weit verbreitete Arten der Projektion, nämlich die Kegelprojektion, die Fächerprojektion und die Parallelprojektion [56, 91, 102]. Für die optische Computertomographie, speziell auch für SLOT, ist die Parallelprojektion die übliche Konfiguration [127, 171, 170]. Die Parallelprojektion wird auch in der Literatur zur tomographischen Rekonstruktion als de-facto Standard behandelt, da sie konzeptionell die einfachste Art der Projektion ist [102, 187, 26]. Daher wird auch in dieser Arbeit die Parallelprojektion für alle Betrachtungen zugrunde gelegt. Sämtliche Formalismen und Ergebnisse lassen sich jedoch analog auf andere Konfigurationen verallgemeinern.

Mathematisch wird die Parallelprojektion einer Probe als Integral-Transformation einer Verteilung entlang von Linien ausgedrückt [154, 187]. Diese Operation wird als Radon-Transformation bezeichnet. Da sich eine Parallelprojektion ebenenweise aufteilen lässt, wird im Folgenden ohne Einschränkung die zweidimensionale Radon-Transformation betrachtet. Die Linien entlang derer die Integration erfolgt, werden anhand ihres Abstandes ρ zur Rotationsachse und des Polarwinkels θ parametrisiert (vgl. Abb. 2.1). Die Radon-Transformation \mathcal{R} überführt eine Verteilung $g(x, y)$ aus einem räumlichen Koordinatensystem in ihren Projektionsdatensatz $p(\rho, \theta)$ in einem Polarkoordinatensystem:

$$p(\rho, \theta) := \mathcal{R}\{g(x, y)\}(\rho, \theta) := \int_{L(\rho, \theta)} ds g(x, y) = \iint dx dy g(x, y) \delta(\rho - x \cos \theta - y \sin \theta) \quad (2.6)$$

Die Integration erfolgt dabei entlang aller Linien $L(\rho, \theta)$ mit $\rho \in (-\infty, \infty)$ und $\theta \in [0, 2\pi)$. Wenn die Funktion $g(x, y)$ bestimmten Regularitätsbedingun-

gen genügt, dann ist die Radon-Transformation invertierbar [154]. In der Praxis liegt die Transformation auf einem endlichen, diskreten Raster vor. Für diese diskrete Radon-Transformation existieren Algorithmen zur numerischen Rekonstruktion der Verteilung $g(x, y)$, auf die in Abschnitt 2.3 eingegangen wird.

Das Sinogramm

Um abschließend eine fundamentale Eigenschaft der Radon-Transformation einzuführen, sollen die Projektionsdaten eines einzelnen Punktes betrachtet werden. Sei dazu $g(x, y) = g_0 \cdot \delta(x - x_0)\delta(y - y_0)$, d.h. die Verteilung besitzt am Punkt $P(x_0, y_0)$ den Wert g_0 und verschwindet sonst. Nach einigen Umformungen lässt sich einsehen, dass der Projektionsdatensatz die Form einer Sinuskurve hat, deren Amplitude und Phase durch die Position des Punktes bestimmt sind [102]. Diese Trajektorie ist gegeben durch:

$$\rho(\theta) = \rho_0 \sin(\theta + \theta_0), \quad (2.7)$$

wobei $\rho_0 = \sqrt{x_0^2 + y_0^2}$ und $\theta_0 = \tan^{-1}(x_0/y_0)$ die Polarkoordinaten des Punktes in der Ebene sind. Nur genau entlang dieser Sinuskurve besitzt der Projektionsdatensatz einen endlichen Wert von g_0 , siehe auch Abb. 2.1. Da die Radon-Transformation eine lineare Abbildung ist, kann dieses Argument auf beliebige Verteilungen verallgemeinert werden: für beliebige Funktionen $g(x, y)$ ergibt sich der Projektionsdatensatz als Addition der Funktionswerte an den Orten (x, y) entlang der zugehörigen Sinuskurven im Projektionsdatensatz. Aus diesem Grund wird ein solcher Projektionsdatensatz $p(\rho, \theta)$ auch als *Sinogramm* bezeichnet.

2.3 DIGITALE REKONSTRUKTION DURCH INVERSE RADON-TRANSFORMATION

Die tomographische Rekonstruktion ist ein eigenständiges Forschungsfeld und es existieren etliche Algorithmen zur numerischen Inversion der Radon-Transformation [91, 102]. Diese lassen sich im Wesentlichen in zwei Klassen unterteilen: einerseits analytische Algorithmen und andererseits iterative Algorithmen [56]. Eine detaillierte Darstellung der Funktionsweise der Algorithmen ist für das Verständnis dieser Arbeit nicht nötig und es wird an gegebener Stelle auf die Literatur verwiesen. Im Folgenden soll vermittelt werden, welche Prinzipien den beiden Klassen zugrunde liegen und was sie unterscheidet. Wichtige Algorithmen aus den verschiedenen Klassen werden exemplarisch vorgestellt.

Analytische Algorithmen zur Radon-Inversion

Die analytischen Algorithmen zur numerischen Rekonstruktion basieren in der Regel auf einer Lösung der Integralgleichung 2.6, die analytisch und ebenfalls in Integralform angegeben wird [56]. Beispielsweise kann nachfolgende Formel gezeigt werden [187]:

$$g(x, y) = \int_0^{2\pi} d\theta \bar{p}(x \cos \theta + y \sin \theta, \theta), \quad (2.8)$$

wobei

$$\bar{p}(\rho, \theta) := \mathcal{F}_{\rho' \rightarrow \rho}^{-1}\{|\rho'|\} \cdot \mathcal{F}_{\rho \rightarrow \rho'}\{g(\rho, \theta)\} \quad (2.9)$$

eine Filterung der Projektionsdaten in radialer Richtung darstellt. Dabei sind \mathcal{F} bzw. \mathcal{F}^{-1} die Operatoren für die eindimensionale Fourier-Transformation

entlang der Radialkoordinate und ihre Umkehrung. Diese Gleichungen stellen die Grundlage für die *gefilterte Rückprojektion*, kurz FBP (engl. *filtered back projection*), dar. Dazu wird zunächst die Filterung des Sinogramms im Fourierraum mit Gleichung 2.9 durchgeführt und anschließend die sogenannte Rückprojektion nach Gleichung 2.8. Für eine detaillierte Beschreibung der Implementation wird auf [187] verwiesen. Der FBP Algorithmus gehört zu den am häufigsten eingesetzten Algorithmen zur tomographischen Rekonstruktion, nicht zuletzt wegen der Existenz von hochgradig effizienten numerischen Implementationen [102, 132, 144].

In der Klasse der iterativen Rekonstruktionsalgorithmen wird die diskrete Radon-Transformation durch lineare Algebra beschrieben und invertiert. Da die Radon-Transformation linear ist, lässt sie sich diskretisieren und in Matrixform darstellen [187]:

Iterative Algorithmen zur Radon-Inversion

$$\underline{\mathbf{R}} \cdot \vec{\mathbf{g}} = \vec{\mathbf{p}} \quad (2.10)$$

Dabei stellt $\vec{\mathbf{g}}$ die Bildpunkte des Datensatzes in der Ebene und $\vec{\mathbf{p}}$ die Bildpunkte des Sinogramms dar, welche jeweils als eindimensionale Vektoren geschrieben sind. Dazu werden die diskreten Positionen im Ortsraum bzw. die Polarkoordinaten des Sinogramms auf eindeutige Art indiziert. Die diskrete Radon-Transformation selbst wird durch eine Matrix ausgedrückt.

$$\underline{\mathbf{R}} = \begin{pmatrix} -\vec{\mathbf{R}}_1- \\ \vdots \\ -\vec{\mathbf{R}}_k- \\ \vdots \\ -\vec{\mathbf{R}}_K- \end{pmatrix}$$

Die Multiplikation des Datensatzes \mathbf{g} mit den Zeilenvektoren der Matrix führt die diskrete Integration entlang der Strahlen aus. Jeder Zeilenvektor enthält eine Anzahl an $N_x \cdot N_y$ Elementen, wobei $N_x \cdot N_y$ die Anzahl der Bildpunkte der zu rekonstruierenden Verteilung ist. Die Indices $k = 1, \dots, K$ der Zeilen sind jeweils einem Strahl $L(\rho_k, \theta_k)$ eindeutig zugeordnet, wobei $K = N_\rho \cdot N_\theta$ die Anzahl der Bildpunkte des Sinogramms ist. Die Gestalt der Systemmatrix ist in der Regel nicht quadratisch und führt außerdem zu einem schlecht konditionierten Problem [187]. Weiterhin können Messfehler zu einem inkonsistenten Gleichungssystem führen. In der Regel kann keine exakte Lösung, welche $\underline{\mathbf{R}} \cdot \vec{\mathbf{g}} = \vec{\mathbf{p}}$ erfüllt gefunden werden. Daher wird gefordert, dass eine numerische Lösung das Gleichungssystem innerhalb einer Toleranz ϵ löst, formal $\|\underline{\mathbf{R}} \cdot \vec{\mathbf{g}} - \vec{\mathbf{p}}\|_2 < \epsilon$. Doch auch hier liegen viele lokale Minima vor, sodass zusätzlich sogenannte Regularisierungs-Bedingungen an eine numerische Lösung \mathbf{g} gestellt werden [79, 187]. Eine häufig verwendete Bedingung ist die Forderung nach einer minimalen 2-Norm der Lösung, formal als ℓ_2 -Regularisierung bezeichnet:

$$\min \|\vec{\mathbf{g}}\|_2 \quad \text{s.t.} \quad \|\underline{\mathbf{R}} \cdot \vec{\mathbf{g}} - \vec{\mathbf{p}}\|_2 < \epsilon \quad (2.11)$$

Tatsächlich kann gezeigt werden, dass unter gewissen Bedingungen auch die analytischen Algorithmen eine Lösung der ℓ_2 -Regularisierung liefern [187].

Ein iteratives Verfahren aus der Mathematik zur Lösung des Problems 2.11 ist der Kaczmarz Algorithmus, welcher in der CT auch als ART (engl. *Algebraic Reconstruction Technique*) bekannt ist [101, 124]:

$$\vec{g}^{(j+1)} = \vec{g}^{(j)} + \frac{p_k - \langle \vec{R}_k, \vec{g}^{(j)} \rangle}{\|\vec{R}_k\|_2} \cdot (\vec{R}_k)^T \quad (2.12)$$

Dort wird in jedem Schritt $j \rightarrow j + 1$ ein Strahl k ausgewählt entlang dessen die aktuelle Lösung mit einem Korrekturterm beaufschlagt wird. Die Auswahl der Strahlen k kann sequentiell [187], randomisiert [183] oder nach geometrischen Kriterien [73] erfolgen. Zudem existiert eine Weiterentwicklung des ART Algorithmus, die als SART (engl. *Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique*) bezeichnet wird und ein schnelleres Konvergenzverhalten zeigt [6, 98, 192]. Dazu wird bei jedem Iterationsschritt über alle Strahlen aus einem Projektionswinkel gemittelt.

Ein wesentlicher Vorteil der iterativen gegenüber den analytischen Algorithmen ist, dass neben der ℓ_2 -Regularisierung auch andere Ansätze verwendet werden können. Insbesondere seit der Veröffentlichung des Compressed Sensing (CS) Paradigmas werden entsprechende Regularisierungen in der tomographischen Rekonstruktion verwendet [26, 99, 124, 144]. Statt einer minimalen ℓ_2 -Norm der Lösung kann beispielsweise eine minimale Totale Variation (TV) gefordert werden [26, 197]:

$$\min \|\vec{g}\|_{TV} \quad \text{s.t.} \quad \|\mathbb{R} \cdot \vec{g} - \vec{p}\|_2 < \epsilon, \quad (2.13)$$

wobei $\|\vec{g}\|_{TV} = \sqrt{(\delta_x \vec{g})^2 + (\delta_y \vec{g})^2}$ die TV-Norm ist, welche ein Maß für die Steigung der Gradienten der Lösung darstellt. Yu *et al.* beschreiben in [197] eine Abwandlung des SART Algorithmus der diese Regularisierung berücksichtigt. Dieser Algorithmus wird in der vorliegenden Arbeit als SART Algorithmus mit TV Minimierung bezeichnet. Die Anwendung der auf CS basierenden Algorithmen bietet sich an, falls die Messdaten in gewissen Basen dünn besetzte Darstellungen besitzen [26, 39]. In solchen Fällen können, sogar mit drastisch reduziertem Messaufwand, die Ergebnisse der klassischen Algorithmen qualitativ übertroffen werden [26, 124, 197].

2.4 OPTISCHE COMPUTERTOMOGRAPHIE MIT SLOT

*Experimenteller Aufbau
von SLOT*

P3-460-A-FC-1

Single Mode Patch Cable
450-600 nm, Thorlabs, USA

H10Z1218MP

1/2" 12-120mm f1.8 10X
Motorized Zoom, Computar
Optics Group, USA

ProSeries II Scan Head

Cambridge Technology,
Deutschland

S4LFT0080/121

Telecentric F-Theta,
Sill Optics, Deutschland

SLOT ist optische Computertomographie mit Laserlicht, die eine physikalische Radon-Transformation einer Probe aufnimmt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 2.2 dargestellt. Die Lichtquelle (LQ) des Aufbaus besteht aus einer Reihe an Dauerstrich-Laserdioden und Lasermodulen. Diese werden über dichroitische Strahlkombinierer überlagert und mit einer Singlemode-Faser (SMF, P3-460-A-FC-1) in ein motorisiertes $10\times$ Zoomlinsensystem (ZL, H10Z1218MP) eingekoppelt. Das Zoomlinsensystem dient sowohl der Kollimation des Laserlichts aus der Faser als auch der Einstellung des Strahldurchmessers. Daraufhin läuft das Licht in ein galvanometrisches 2-Achsen Scansystem (xy-SS, ProSeries II Scan Head). In Kombination mit einer telezentrischen f- Θ Scanlinse (FTL, S4LFT0080/121) ermöglicht das Scansystem das Abrastern der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl in der xy-Ebene. Die zu

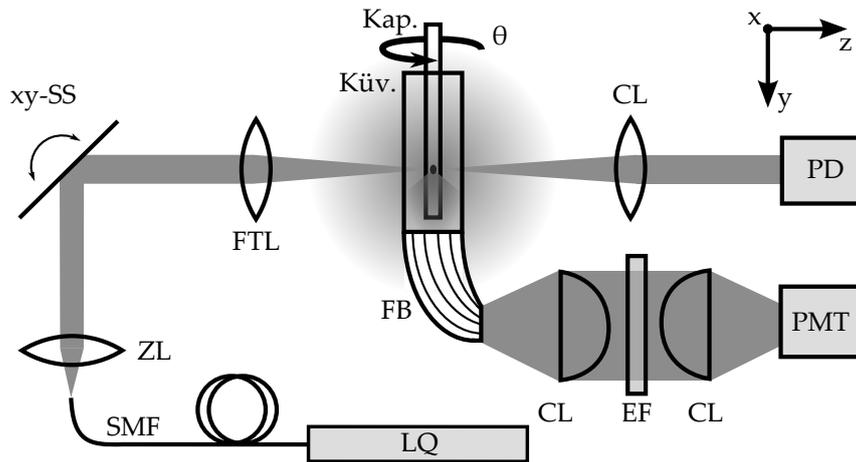


Abbildung 2.2: Schema des in dieser Arbeit verwendeten SLOT Aufbaus. Eine Laserlichtquelle wird über eine Singlemode-Faser in ein motorisiertes Zoomlinsensystem eingekoppelt. Dort wird der Strahldurchmesser eingestellt und der Strahl kollimiert. Mit einer Kombination aus 2-Achsen Scansystem und telezentrischer $f-\theta$ Linse wird die Probe mit einem schwach fokussierten Nadelstrahl in der xy -Ebene abgerastert. Der Strahl ist auf die Rotationsachse fokussiert mit der die Probe rotiert wird. Die Probe selber befindet sich in einer Glaskapillare, welche ihrerseits in einer Glasküvette mit planen Eintrittsfenstern positioniert ist. Die Glasküvette ist mit einer Flüssigkeit, dem Badfluid gefüllt. Das transmittierte Laserlicht wird mit einer Photodiode detektiert. Das in der Probe erzeugte Fluoreszenz- und Streulicht wird mit einem Faserbündel gesammelt und mit einem Kondensorenlinsepaar auf einen Photomultiplier-Detektor abgebildet. Durch einen austauschbaren Emissionsfilter kann der Wellenlängenbereich der gemessenen Strahlung selektiert werden.

Abkürzungen: LQ: Laserlichtquelle, SMF: Singlemode-Faser, ZL: Zoomlinsensystem, xy -SS: 2-Achsen Scansystem, FTL: $f-\theta$ Linse, PD: Photodiode, FB: Faserbündel, CL: Kondensorenlinse PMT: Photomultiplier-Detektor, EF: Emissionsfilter

untersuchende Probe befindet sich im Inneren einer quadratischen Glasküvette mit planen Eintrittsfenstern. Die Küvette ist mit einer Flüssigkeit, dem sogenannten Badfluid gefüllt, welches üblicherweise der Brechungsindexanpassung der Probe dient. In dieser Arbeit werden die Proben zudem nochmals in einer Glaskapillare gehalten, um die Proben unter sterilen Bedingungen zu halten. Die Kapillare ist starr mit der Rotationsachse der Probenkammer verbunden. Die Rotation der Probe wird dabei von einem Rotationstisch mit Schrittmotor (M-060.PD) realisiert. Die Probe befindet sich auf der Rotationsachse und im Fokus der rasternden Laserstrahlen. Durch geeignete Einstellung des Strahldurchmessers wird die numerische Apertur stets so gewählt, dass die Schärfentiefe der Strahlen gerade die maximale Ausdehnung der Probe in Strahlrichtung überdeckt [82, 127]. Die numerische Apertur wird dadurch in der Regel so klein, dass der rasternde Laserstrahl als Lichtstrahl im Sinne der geometrischen Optik verstanden werden kann [82]; er wird daher auch als Nadelstrahl bezeichnet. In Transmissionsrichtung wird die Intensität der Lichtstrahlen nach dem Durchlauf der Probe mit einer Photodiode (PD, PDA36A)

M-060.PD
Präzisionsdrehtisch,
Physik Instrumente (PI)
GmbH, Deutschland

PDA36A
Si Switchable Gain
Detector, Thorlabs

STRALA
LED-Dekoleuchte, IKEA,
Deutschland

gemessen. Das in der Probe gestreute Licht sowie eventuell erzeugtes Fluoreszenzlicht werden durch ein Glasfaserbündel (FB, STRALA) gesammelt und durch ein Kondensorenlinsepaar (CL) auf die aktive Fläche eines Photomultiplier-Detektors (PMT, R3896) abgebildet. Ein austauschbarer Emissionsfilter (EF) erlaubt die Auswahl des gemessenen Wellenlängenbereichs. Für jede Rasterposition des Nadelstrahls werden die Signale der Detektoren digitalisiert und an einem Rechner zu einem Projektionsdatensatz für jeden Kanal zusammengesetzt.

SLOT CONTROL Software

Die Steuerung des SLOT Versuchsaufbaus erfolgt mit der Software SLOT CONTROL. Diese wurde in paritätischer Zusammenarbeit des Autors der vorliegenden Arbeit mit Dr. Raoul-Amadeus Lorbeer am Laser Zentrum Hannover e.V. von Grund auf entwickelt und implementiert. Dazu wurde ein modulares Konzept verfolgt und in C++ umgesetzt, welches die Integration von verschiedenen Systemkomponenten zu einer funktionsfähigen SLOT-Einheit erlaubt. Die Software steuert derzeit drei Laboraufbauten mit teils unterschiedlichen Komponenten. Zur Bedienung existiert eine grafische Benutzeroberfläche (GUI), welche die Steuerung der angeschlossenen Systemkomponenten ermöglicht und die Datenerfassung übernimmt.

Datenverarbeitung und
digitale Rekonstruktion

Die mit SLOT generierten Projektionsdatensätze können als physikalische Radon-Transformationen der Probe mit einer Parallelprojektion aufgefasst werden. Es wird ein Stapel von Projektionsdatensätzen generiert, indem die Probe schrittweise rotiert wird, bis eine volle Umdrehung erreicht ist. Bevor die Datensätze jedoch rekonstruiert werden, durchlaufen sie eine digitale Vorprozessierung. Diese entfernt erstens einen Zeilenversatz (Interlace) aus den Projektionsdaten, der sich durch die Trägheit der Scannerspiegel ergibt. Zweitens wird das Rotationszentrum des Bildes identifiziert und zur Bildmitte geschoben, da dies in Implementationen der inversen Radon-Transformation in der Regel vorausgesetzt wird. Diese Schritte der digitalen Datenverarbeitung sind in [82] ausführlich beschrieben. Abschließend wird der so vorbehandelte Bildstapel zu einer volumetrischen Darstellung der Probe rekonstruiert. Bei SLOT wird dazu standardmäßig der FBP-Algorithmus verwendet.

KORREKTUR VON ARTEFAKTEN DURCH LICHTBRECHUNG IN SLOT

ZIEL dieses Kapitels ist die Beschreibung, Analyse und die Korrektur von Artefakten aufgrund von Lichtbrechung in SLOT. Für die *in vitro* Bildgebung, beispielsweise von Zellaggregaten, ist eine Halterung in einer Glaskapillare oft sinnvoll, wie in Abschnitt 3.1 erläutert wird. Die Lichtbrechung an dieser Kapillare führt zu Bildartefakten in den rekonstruierten tomographischen Daten. In Abschnitt 3.2 wird der Einfluss der Lichtbrechung zunächst anhand von theoretischen und numerischen Berechnungen analysiert. Daraufhin wird in Abschnitt 3.3 ein Algorithmus zur Korrektur der Bildfehler vorgestellt und in Abschnitt 3.4 an experimentellen Daten validiert. Zum Schluss des Kapitels werden die Ergebnisse zusammengefasst.

3.1 ASPEKTE DER IN VITRO BILDGEBUNG VON ZELLAGGREGATEN MIT SLOT

Bislang wurde SLOT fast ausschließlich zur *ex vivo* Bildgebung von aufgeklärten biologischen Proben angewandt, sodass insbesondere keine Lichtbrechung bei der Durchleuchtung der Proben auftrat (vgl. Abschnitt 1.2). In dieser Arbeit wird der Einsatz von SLOT für die *in vitro* Bildgebung von Zellaggregaten aus humanen pluripotenten Stammzellen untersucht. Um Bewegungsartefakte zu verhindern, müssen die Zellen für die Messung immobilisiert werden [82]. Dazu können Agarose- oder Kollagen-Gele auf Basis des Zellkulturmediums verwendet werden, welche die Nährstoffversorgung und die Kultivierung der Aggregate ermöglichen [184]. Zudem gibt es weitere Randbedingungen, welche bei der Bildgebung erschwerend hinzukommen. So sollen die Zellaggregate vor Kontamination geschützt sein und unter Bedingungen bildgegeben werden, die mit der Zellkultur vergleichbar sind. Dies kann durch eine Haltung der immobilisierten Zellaggregate innerhalb einer versiegelten zylindrischen Glaskapillare erreicht werden [142]. Im Vergleich zu dem Glas der Kapillare hat das Zellkulturmedium im Inneren der Kapillare einen niedrigeren Brechungsindex. Die beleuchtenden Nadelstrahlen erfahren daher an der inneren Grenzfläche der Kapillare eine Brechung. Die Kapillare selbst ist in einer Küvette gelagert, die mit einem Badfluid gefüllt ist. Falls das Badfluid einen Brechungsindexunterschied zum Glas der Kapillare aufweist, tritt auch an der äußeren Grenzfläche der Kapillare eine Lichtbrechung auf. Die Beschreibung der Lichtbrechung an den Grenzflächen der Kapillare in Abhängigkeit vom verwendeten Badfluid erfolgt im nächsten Abschnitt. An der Küvette tritt keine Brechung auf, da sie ein planes Eintrittsfenster zur Verfügung stellt, welches senkrecht zur Einfallsrichtung der Strahlen orientiert ist.

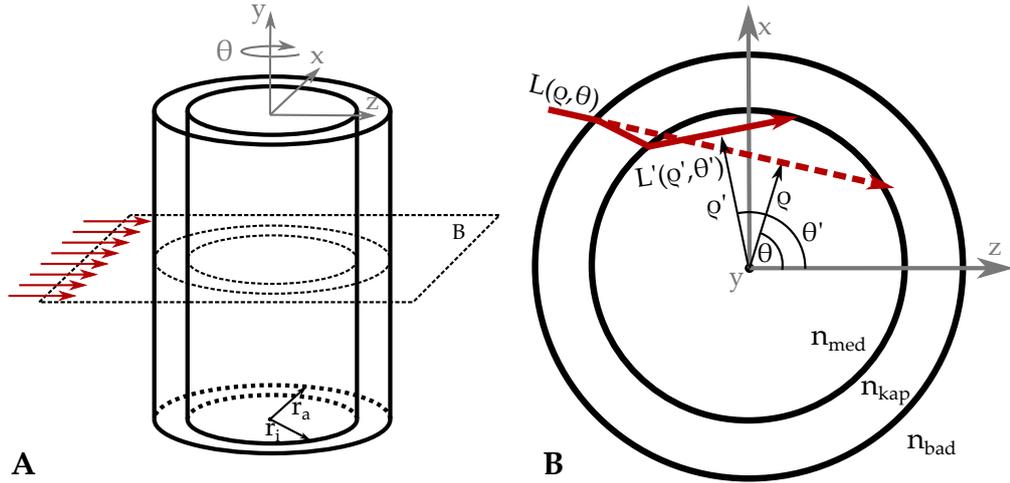


Abbildung 3.1: Geometrische Beschreibung der Brechung an einer Glaskapillare. **A** Eine Kapillare wird als Hohlzylinder mit Innenradius r_i und Außenradius r_a beschrieben. Die Rotationsachse des SLOT Aufbaus liegt in der Symmetrieachse der Kapillare. Die Kapillare wird ebenenweise mit Nadelstrahlen abgerastert. Da die Lichtbrechung in der Einfallsebene erfolgt, kann das Problem auf zwei Dimensionen reduziert werden. **B** Lichtbrechung in der Einfallsebene. Ein von außen einfallender Lichtstrahl mit den Koordinaten $L(\theta, \rho)$ wird in das Innere der Kapillare gebrochen und propagiert als Strahl mit den Koordinaten $L'(\theta', \rho')$. Das gemessene Signal der Probe entsteht im Inneren der Kapillare. Daher ist nur dort der Strahlverlauf relevant.

3.2 EFFEKTE DER LICHTBRECHUNG AN EINER GLASKAPILLARE IN SLOT

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Lichtbrechung auf die mit SLOT generierten tomographischen Datensätze für Proben innerhalb einer Glaskapillare untersucht. Durch die Lichtbrechung werden die mit SLOT aufgenommenen Projektionsdaten verzerrt und es treten Artefakte in den rekonstruierten Daten auf. In diesem Abschnitt erfolgt die Untersuchung und Beschreibung der Effekte auf die Projektionsdaten und die rekonstruierten tomographischen Datensätze anhand theoretischer Überlegungen und numerischer Simulationen.

3.2.1 Theoretische und numerische Beschreibung

Um die Lichtbrechung an der Kapillare in SLOT zu analysieren, wird die Brechung der Nadelstrahlen mit geometrischer Optik beschrieben. Aberrationen der Nadelstrahlen selbst werden aufgrund der in SLOT üblicherweise geringen numerischen Apertur (hier $NA \approx 0,03$) vernachlässigt [17]. Die Glaskapillare wird als Hohlzylinder mit Innenradius r_i , Außenradius r_a und homogenem Brechungsindex n_{kap} beschrieben (siehe Abb. 3.1 A). Die Symmetrieachse der Kapillare soll identisch mit der Rotationsachse (y -Achse) sein. Bei SLOT wird eine Probe mit parallelen Strahlen in Ebenen senkrecht zur Rotationsachse (siehe Abb. 3.1 A) abgerastert. Unter den genannten Voraussetzungen erfolgt die Ausbreitung der Strahlen nach der Brechung in der Einfallsebene

ne (xz -Ebene). Weiterhin erfolgt die Strahlausbreitung in allen Einfallsebenen gleich. Daher genügt es, die Strahlpropagation der xz -Ebene zu betrachten und so das Problem auf zwei Dimensionen zu reduzieren. Darüber hinaus wird nur der Strahlverlauf bis ins Innere der Kapillare betrachtet, da ausschließlich innerhalb der Kapillare ein Signal durch die Probe entsteht. Die Detektion von Streulicht und Fluoreszenzlicht erfolgt transversal zur Beleuchtung mit großer Sammeleffizienz durch einen Punktdetektor. Dadurch spielt eine Brechung des Lichts beim Austritt aus der Kapillare keine Rolle. Lediglich im Transmissionskanal können Abschattungen dadurch entstehen, dass die Strahlen beim Austritt aus der rückseitigen Grenzfläche der Kapillare zu stark gebrochen werden; Abschattungen werden in diesem Fall dadurch verursacht, dass die gebrochenen Nadelstrahlen von der Kondensorlinse nicht mehr auf die Photodiode abgelenkt werden.

Die Propagation eines einfallenden Strahls in der xz -Ebene ist durch die räumliche Brechungsindexverteilung von Bad, Kapillare und Medium gegeben (siehe Abb. 3.1 B). Die gesamte Brechungsindexverteilung wird aus stückweise konstanten Abschnitten modelliert. Dabei ist n_{bad} der Brechungsindex des Badfluids außerhalb der Kapillare, n_{kap} der Brechungsindex des Glases der Kapillare und n_{med} der Brechungsindex des Kulturmediums innerhalb der Kapillare. Damit ergibt sich insbesondere, dass ein geradlinig von außen einfallender Lichtstrahl $L(\rho, \theta)$ im Inneren der Kapillare auch als gerader Strahl propagiert. Diesem ins Innere gebrochenen Strahl kann eine Koordinatendarstellung $L'(\rho', \theta')$ zugeordnet werden. Diese einfache Erkenntnis ist von grundlegender Bedeutung, denn so lässt sich eine Beziehung zwischen einem Satz von Parallelprojektionen und den durch Lichtbrechung verzerrten Projektionen herstellen.

Brechung eines einfallenden Lichtstrahls

Die Koordinaten (ρ', θ') des Strahls im Inneren der Kapillare ergeben sich aus den Koordinaten (ρ, θ) des einfallenden Lichtstrahls durch Anwendung des Brechungsgesetzes an beiden Grenzflächen. Die Ausdrücke lassen sich vereinfachen zu (siehe Anhang A):

Analytische Beschreibung der Lichtbrechung

$$\rho'(\rho, \theta) = n_{\text{bad}}/n_{\text{med}} \cdot \rho \quad (3.1)$$

$$\theta'(\rho, \theta) = \theta + \Delta\theta(\rho'). \quad (3.2)$$

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in den Funktionsargumenten auf die Brechungsindizes n_{bad} , n_{med} , n_{kap} und die Radien r_i , r_a der Kapillare verzichtet. Für die Radialkoordinate ρ' ergibt sich, dass sie über einen Skalierungsfaktor mit der Radialkoordinate ρ des einfallenden Strahls verknüpft ist. Die Polarkoordinate θ' kann als Summe der Polarkoordinate des einfallenden Strahls θ und eines Winkelversatzes $\Delta\theta$ geschrieben werden. Aufgrund der Rotationssymmetrie der räumlichen Brechungsindexverteilung folgt, dass $\Delta\theta$ zwar von den Radien der Kapillare, den auftretenden Brechungsindizes sowie der Radialkoordinate ρ' , jedoch nicht von der Polarkoordinate θ des einfallenden Strahls abhängt. Dieser Sachverhalt hat für die Beschreibung und Korrektur der Artefakte durch Lichtbrechung in den nachfolgenden Abschnit-

ten eine besondere Bedeutung und wird dort ausführlicher aufgegriffen. Für den Winkelversatz lässt sich folgender geschlossene Ausdruck finden:

$$\Delta\theta(\rho') = \Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{kap}}} + \Delta\Theta(\rho'), \quad \rho' \geq 0 \quad (3.3)$$

$$\Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{kap}}} = \sin^{-1}(n_{\text{med}}/n_{\text{bad}} \cdot \rho'/r_a) - \sin^{-1}(\rho'/r_i), \quad (3.4)$$

wobei $\Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{kap}}}$ der Winkelversatz für den Spezialfall einer Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare, also $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$, ist. In jenem Fall tritt Brechung nur an der inneren Grenzfläche der Kapillare auf. Falls an beiden Grenzflächen eine Brechung auftritt, muss der additive Term $\Delta\Theta(\rho')$ berücksichtigt werden. Dieser lässt sich schreiben als:

$$\Delta\Theta(\rho') = \cos^{-1} \left(\frac{\left(\frac{n_{\text{med}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho' \right)^2 + \sqrt{r_a^2 - \left(\frac{n_{\text{med}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho' \right)^2} \cdot \sqrt{r_i^2 - \left(\frac{n_{\text{med}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho' \right)^2}}{r_i r_a} \right)$$

Die zuvor beschriebenen analytischen Ausdrücke ergeben sich aus der wiederholten Anwendung des Brechungsgesetzes an den Grenzflächen der Kapillare. Wegen der Spiegelsymmetrie der Brechungsindexverteilung an der z-Achse gilt außerdem $\Delta\theta(-\rho') = -\Delta\theta(\rho')$. Die Herleitungen der zuvor beschriebenen Gleichungen befinden sich im Anhang A.

Brechung und mittlerer
Winkelversatz

Der ortsabhängige Winkelversatz durch die Brechung bestimmt die Stärke und Form der Verzerrung der Projektionsdaten. Je stärker diese verzerrt sind, umso deutlicher sind Artefakte in den rekonstruierten Tomogrammen zu erwarten. Eine detaillierte Analyse der Artefakte durch die Lichtbrechung erfolgt im nächsten Abschnitt. Zunächst wird untersucht, wie sich die Verzerrung der Projektionsdaten abhängig vom Brechungsindex des Bades verhält. Um ein Maß für die Stärke der Verzerrung durch die Lichtbrechung zu erhalten, wird der mittlere absolute Winkelversatz $\langle \Delta\theta \rangle$ wie folgt definiert:

$$\langle \Delta\theta \rangle := \frac{1}{r_i} \int_0^{r_i} d\rho' |\Delta\theta(\rho')|. \quad (3.5)$$

Diese Größe ist der Mittelwert des Betrages des Winkelversatzes über die Strahlpositionen innerhalb der Kapillare. Dieser Winkelversatz ist abhängig von den Brechungsindizes von Bad, Kapillare und Medium sowie von den Dimensionen der Kapillare. Diese Parameter werden für die folgenden Berechnungen festgehalten und finden sich in Tabelle 3.1. Das Zellkulturmedium (mTeSRTM₁) und die Glaskapillare (intraMARK 200µl) sind dieselben, die in den Experimenten verwendet werden.

mTeSRTM₁
STEMCELL Technologies,
Canada

intraMARK 200µl
BRAND GmbH + Co KG,
Deutschland

Numerische Simulation des
Winkelversatzes

Zur Berechnung des mittleren Winkelversatzes wurde das Integral aus Gleichung 3.5 mit 500 Stützstellen numerisch berechnet. Die Integration wurde mit der Trapezregel durchgeführt [57]. Auf diese Weise wurde $\langle \Delta\theta \rangle$ für $n_{\text{bad}} = 1,000$ bis $n_{\text{bad}} = 1,600$ in Schritten von 0,001 bestimmt. Die Berechnungen wurden mit einem eigens dafür erstellten OCTAVE [47] Programm durchgeführt und das Ergebnis ist in Abb. 3.2 dargestellt. Der mittlere absolute Winkelversatz zeigt ein Minimum für einen Brechungsindex des Bades von $n_{\text{bad}} = 1,252$. Weitere Simulationen ergaben, dass die Existenz und Lage

Bezeichnung		Parameter	
Kulturmedium	mTeSR™1	Brechungsindex	$n_{med} = 1,339$
Glaskapillare	intraMARK 200µl	Innenradius	$r_i = 0,800$ mm
		Außenradius	$r_a = 1,125$ mm
		Brechungsindex	$n_{kap} = 1,486$

Tabelle 3.1: Parameter der Brechungsindexverteilung. Das gegebene Kulturmedium und die Glaskapillare wurden in den Experimenten und Simulationen verwendet. Die Brechungsindizes sind gegeben bei Raumtemperatur, Umgebungsdruck und bei der Wellenlänge der Natrium D-Linie (589 nm).

des lokalen Minimums abhängig sind von den Radien und dem Brechungsindex der Kapillare sowie von dem Brechungsindex des Mediums. Trotz ausführlicher Recherche konnte kein geeignetes Immersionsfluid gefunden werden, welches bei Raumtemperatur und Normaldruck einen vergleichbaren Brechungsindex aufweist, da schon ein Brechungsindex von weniger als 1,29 für Flüssigkeiten bei Raumtemperatur und Normaldruck ausgesprochen selten ist [3, 80]. Eine Ausnahme davon ist Blausäure (HCN) mit einem Brechungsindex $n = 1,268$, welche allerdings aufgrund ihrer hohen Giftigkeit und des geringen Siedepunktes von 26 °C in der Praxis ungeeignet ist [146].

Im Folgenden sollen deswegen zwei Spezialfälle betrachtet werden: Erstens der Fall, dass eine Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare erfolgt. Für diesen Fall gilt $n_{bad} = n_{kap}$ und somit kann der mittlere absolute Winkelversatz analytisch berechnet werden:

$$\langle \Delta\theta \rangle|_{n_{bad}=n_{kap}} = \frac{\pi - 2}{2} - \sin^{-1} \left(\frac{n_{med}}{n_{kap}} \right) - \frac{n_{kap}}{n_{med}} \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{n_{med}}{n_{kap}} \right)^2} + \frac{n_{kap}}{n_{med}}.$$

Mit den verwendeten Parametern (siehe Tabelle 3.1) ergibt sich 4,416° als mittlerer absoluter Winkelversatz in guter Übereinstimmung (Abweichung $\leq 0,001$) mit der numerischen Berechnung des Integrals. Dieser Spezialfall wird verglichen mit einem Fall, in dem das Zellkulturmedium auch als Bad verwendet wird ($n_{bad} = n_{med}$). Aus der Simulation folgt, dass der mittlere Winkelversatz für den Fall $n_{bad} = n_{med}$ nur etwa halb so groß ist, wie für den Fall $n_{bad} = n_{kap}$. Tatsächlich kann gezeigt werden, dass die Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare stets eine höhere Winkelabweichung produziert, als die Verwendung des Zellkulturmediums als Bad (siehe Anhang A):

$$\langle \Delta\theta \rangle|_{n_{bad}=n_{kap}} > \langle \Delta\theta \rangle|_{n_{bad}=n_{med}} \quad \text{für } n_{kap} > n_{med}. \quad (3.6)$$

Die oben diskutierten Spezialfälle $n_{bad} = n_{kap}$ und $n_{bad} = n_{med}$ lassen sich für viele Glastypen und Zellkulturmedien in praktischen Szenarien reproduzieren [24, 136, 166]. Daher werden in den folgenden Abschnitten exemplarisch insbesondere diese Fälle bezüglich der auftretenden Bildartefakte untersucht.

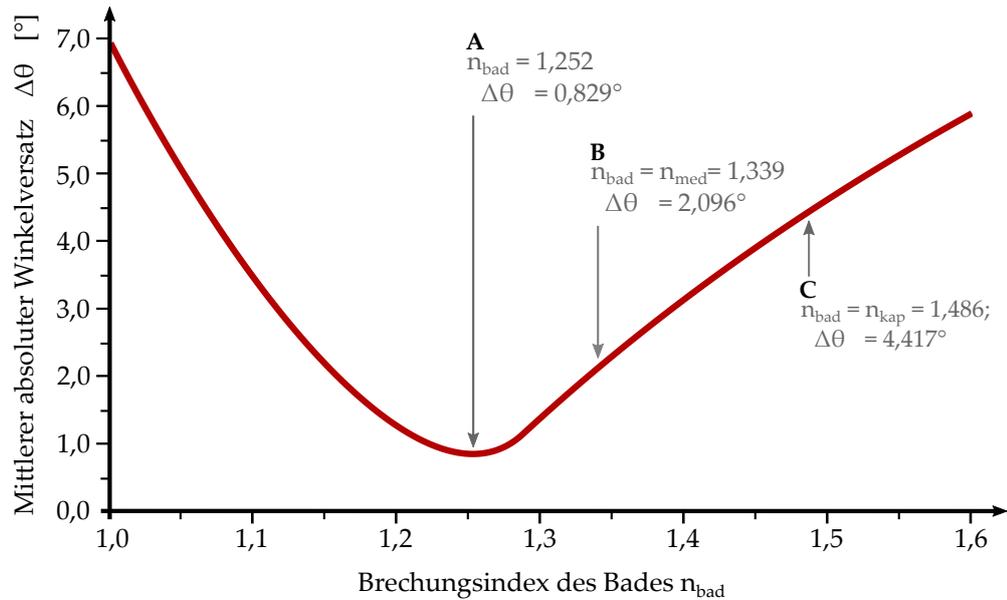


Abbildung 3.2: Mittlere Winkelabweichung als Funktion des Brechungsindex des Bades n_{bad} . Andere Parameter wie in Tabelle 3.1. **A** Minimum der mittleren Winkelabweichung. Es konnte kein Fluid gefunden werden, welches bei Raumtemperatur einen entsprechenden Brechungsindex besitzt. Die weiteren Pfeile markieren folgende Fluide für das Bad: **B** Kulturmedium wie im Inneren der Kapillare, **C** Immersionsfluid mit gleichem Brechungsindex wie die Kapillare.

3.2.2 Numerische Simulation und Analyse von Bildartefakten

Die Projektionsdaten einer Ebene entsprechen dem Sinogramm, welches mit der inversen Radon-Transformation zu einem zweidimensionalen Datensatz rekonstruiert wird (vgl. Abschnitt 2.3). Die inverse Radon-Transformation setzt eine parallele Strahlgeometrie bei der Aufnahme von Projektionsdaten voraus. Allerdings ergeben sich durch die Lichtbrechung an der Glaskapillare signifikante Abweichungen von der parallelen Strahlgeometrie. Die dadurch verzerrten Projektionsdaten entsprechen also nicht der Radon-Transformation des zugrundeliegenden Datensatzes in der Ebene. Daher wird die Anwendung der inversen Radon-Transformation auf die verzerrten Projektionsdaten ein fehlerhaftes Ergebnis liefern. Als Folge dessen entstehen Bildartefakte in den rekonstruierten tomographischen Datensätzen. Aufbauend auf den Grundlagen des vorigen Kapitels wird nun zunächst der Effekt der Lichtbrechung auf die Projektionsdaten untersucht. Anschließend werden die Bildartefakte nach der tomographischen Rekonstruktion anhand von synthetischen Datensätzen beschrieben.

*Effekt der Lichtbrechung
auf Trajektorien in dem
Sinogramm*

Um den Einfluss der Lichtbrechung auf die Projektionsdaten zu verstehen, wird zunächst die Propagation von parallelen Strahlenbündeln ins Innere der Kapillare mit OCTAVE simuliert. Die entsprechenden Strahlverläufe für die beispielhaften Spezialfälle $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ und $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ sind in Abb. 3.3 A, B dargestellt. Die Berechnung ergibt in diesen Fällen, dass der Winkelversatz $\Delta\theta$ mit zunehmender Radialkoordinate ρ' ebenfalls steigt. Randnahe Strahlen innerhalb der Kapillare erfahren also einen stärkeren Winkelversatz als Strahlen,

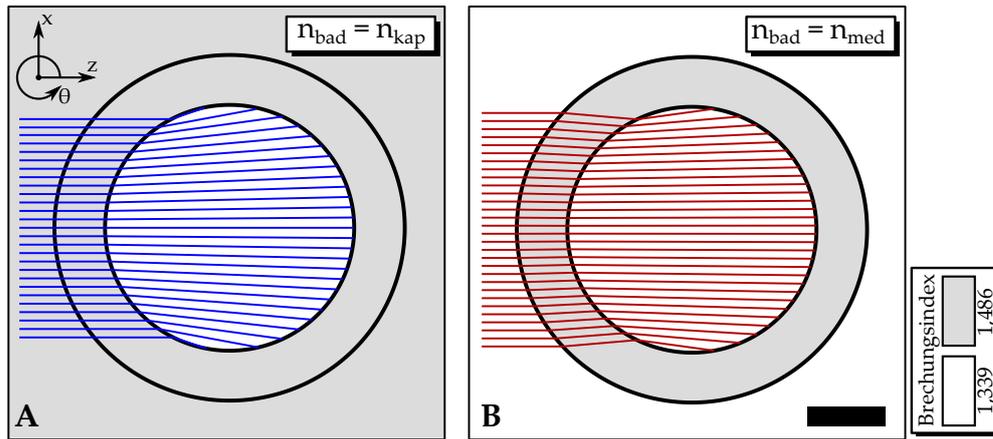


Abbildung 3.3: Simulation der Strahlverläufe für verschiedene Flüssigkeiten des Bades. **A** Der Spezialfall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$: Der Brechungsindex der Glaskapillare wird durch das Bad angepasst. **B** Der Spezialfall $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$: Das Zellkulturmedium, welches sich im Inneren der Kapillare befindet, wird auch als Bad verwendet. Die restlichen Parameter entsprechen Tabelle 3.1. Skalenbalken 0,5 mm.

die dichter am Zentrum liegen. Es ist daher aufschlussreich, die Trajektorie eines Punktes nahe der Innenwand der Kapillare zu betrachten.

Zur Berechnung der Trajektorie eines einzelnen Punktes in der Nähe der Innenwand der Kapillare wurde eine Simulation in OCTAVE umgesetzt. Dort startet ein Punkt P mit den Polarkoordinaten $(\rho_P; \theta_P) = (0,999 \cdot r_i; 0^\circ)$ und vollführt in 1000 Schritten eine volle Umdrehung um die Mittelachse der Kapillare. Für jeden Drehwinkel wird die Radialkoordinate ρ desjenigen einfallenden Strahls, welcher im Inneren der Kapillare den Punkt P passiert, in die Projektionsdaten eingetragen. Die resultierenden Trajektorien sind für die Spezialfälle $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ und $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ in Abb. 3.4 dargestellt. Für eine ideale Parallelprojektion ohne Brechung ergibt sich ein Sinus als Trajektorie des Punktes. In Gegenwart von Lichtbrechung weichen die Trajektorien in der Nähe der Maxima von der Sinusform durch eine Verzerrung entlang der θ -Achse ab. In dem Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ liegt zusätzlich eine Stauchung der Trajektorie entlang der ρ -Achse vor. Für beliebige Radien der Kapillare und Brechungsindizes lassen sich ähnliche Effekte beobachten. Die Gründe dafür werden im nächsten Absatz beschrieben.

Die Form der Trajektorie eines Punktes bei Lichtbrechung kann wie folgt verstanden werden: In den Strahlkoordinaten (ρ', θ') im Inneren der Kapillare beschreibt die Trajektorie des Punktes $P(\rho_P, \theta_P)$ tatsächlich einen sinusförmigen Verlauf in Analogie zu Abschnitt 2.2. Dort gilt $\rho' = \rho_P \cdot \sin(\theta' + \theta_P)$. Die gemessenen Projektionsdaten sind jedoch in den Koordinaten (ρ, θ) der einfallenden Lichtstrahlen aufgenommen. Mit den Gleichungen 3.1 und 3.2 lässt sich die Trajektorie des Punktes P in diesen Koordinaten schreiben als:

$$\rho = n_{\text{med}}/n_{\text{bad}} \cdot \rho_P \cdot \sin(\theta + \theta_P + \Delta\theta(n_{\text{med}}/n_{\text{bad}} \cdot \rho)). \quad (3.7)$$

Es liegen zwei getrennte Effekte vor, die die Form der Trajektorie beeinflussen: Erstens wird die Trajektorie in radialer Richtung mit einem konstanten

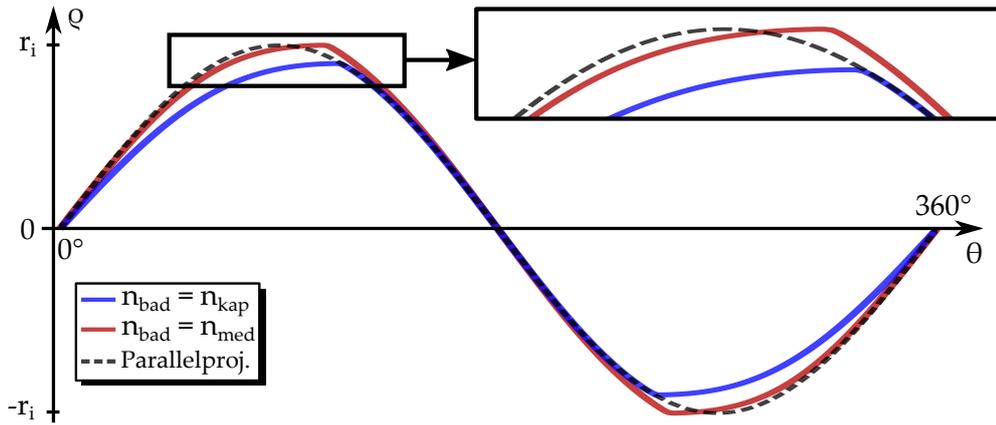


Abbildung 3.4: Trajektorie eines einzelnen Punktes nahe der Innenwand der Kapillare für verschiedene Flüssigkeiten des Bades (nach [8]). Der Abstand des Punktes vom Zentrum der Kapillare entspricht 99,9% des Innenradius der Kapillare. Gezeigt sind die Trajektorien für die Spezialfälle $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ und $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ sowie der sinusförmige Verlauf im Falle einer Parallelprojektion ohne Lichtbrechung. Beide Trajektorien zeigen eine Verzerrung in θ -Richtung gegenüber der Parallelprojektion, wobei im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ zusätzlich noch eine radiale Skalierung auftritt. Parameter entsprechend Tabelle 3.1.

Faktor $n_{\text{med}}/n_{\text{bad}}$ skaliert. Eine radiale Skalierung der Projektionsdaten verursacht eine isotrope Skalierung des rekonstruierten Datensatzes mit dem gleichen Faktor. Der zweite Effekt ist die Addition des radial abhängigen Winkelversatzes im Argument der Sinusfunktion. Da im Allgemeinen $\Delta\theta(\rho')$ nicht konstant ist, führt dies zu einer radial abhängigen Verzerrung entlang der θ -Achse. Es ist dabei zu beachten, dass die Trajektorien aller Punkte in den Projektionsdaten die gleiche Verzerrung erfahren, da $\Delta\theta$ keine Winkelabhängigkeit besitzt. Diese Eigenschaft wird im nächsten Abschnitt zur Korrektur von Bildartefakten durch die Lichtbrechung genutzt. An dieser Stelle wird festgehalten, dass eine durch Lichtbrechung verzerrte Trajektorie nach der inversen Radon-Transformation nicht auf einen Punkt abgebildet wird. Grund dafür ist der radial abhängige Winkelversatz zwischen dem einfallenden und dem ins Innere der Kapillare gebrochenen Strahl. Dies ist die fundamentale Ursache von Bildartefakten in den rekonstruierten tomographischen Daten.

*Simulation von Artefakten
aufgrund von
Lichtbrechung*

Anhand von synthetischen Datensätzen wird im Folgenden die Gestalt der Rekonstruktionsartefakte durch Lichtbrechung beschrieben. Dazu wurde ein OCTAVE Programm erstellt, welches die Projektion eines gegebenen zweidimensionalen Datensatzes durch die Kapillare simuliert. Eine von außen einfallende parallele Strahlverteilung wird durch Anwendung des Brechungsgesetzes an den Grenzflächen in das Innere der Kapillare propagiert. Daraufhin werden die Linienintegrale über den originalen Datensatz entlang der gebrochenen Strahlen numerisch berechnet. Dazu wird die von Toft beschriebene Methode zur numerischen Integration entlang von Linien genutzt [187]. Die numerische Berechnung der Linienintegrale ist zur Maximierung der Berechnungseffizienz in C++ umgesetzt und über das External Code Interface von OCTAVE in das oben erwähnte Programm eingebunden. Als synthetisches Originalbild wird

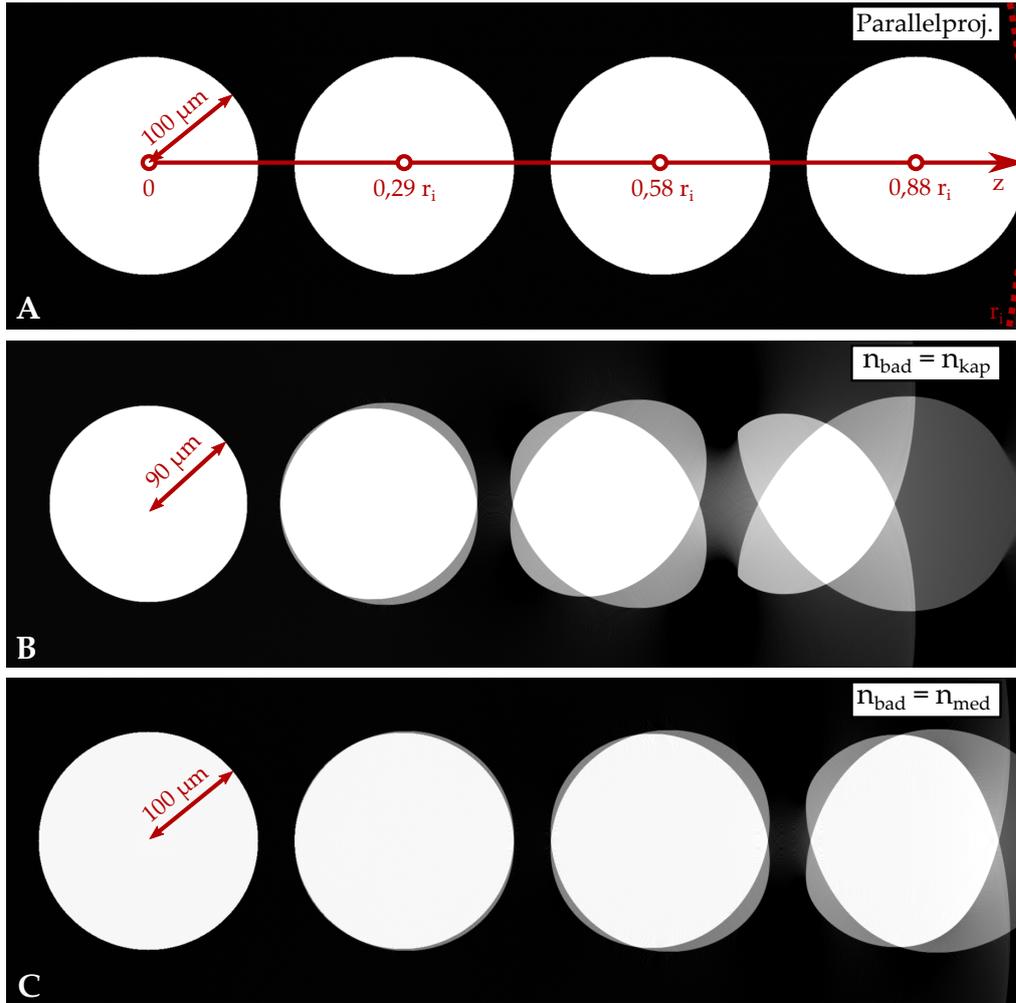


Abbildung 3.5: Simulation der Bildartefakte durch Lichtbrechung in den rekonstruierten tomographischen Datensätzen. Ein synthetisches Originalbild besteht aus vier Kreisen mit verschiedenen Mittelpunkten entlang der z -Achse. Der linke Kreis liegt im Mittelpunkt $(x, z) = (0, 0)$ der Kapillare und der Kreis rechts außen berührt die innere Grenzfläche der Kapillare. Diese ist gestrichelt im oberen Bild eingezeichnet. **A** Rekonstruierter Datensatz für eine Parallelprojektion ohne Glaskapillare. Das Ergebnis ist im Rahmen der numerischen Genauigkeit identisch mit dem Originalbild. Die weiteren Bilder zeigen Rekonstruktion von synthetischen Projektionen durch die Glaskapillare jeweils für die Fälle **B** $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ und **C** $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Rekonstruktionsartefakte im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ an allen Positionen stärker ausgeprägt sind. Zudem tritt eine isotrope Skalierung auf, die das Ergebnis gegenüber dem Originalbild staucht. Diese Skalierung betrifft auch den Kreis im Mittelpunkt der Kapillare, obwohl darüber hinaus keine messbaren Rekonstruktionsartefakte auftreten. Die verwendeten Parameter der Lichtbrechung entsprechen Tabelle 3.1. Die Originaldaten besitzen eine Dimension von 3200×3200 Pixeln, entsprechend einer Ortsauflösung von $0,5 \mu\text{m}$ pro Pixel. Die Rekonstruktion für alle Projektionsdatensätze ist mit dem FBP Algorithmus durchgeführt.

ein synthetisches Bild mit einer Dimension von 3200×3200 Pixeln generiert. Dieses besteht aus vier Kreisen mit Mittelpunkten an verschiedenen Punkten auf der z -Achse im Inneren der Kapillare (siehe Abb. 3.5 A auf Seite 27). Der erste Kreis befindet sich dabei im Mittelpunkt der Kapillare und der vierte Kreis berührt gerade ihre Innenwand. Die zwei weiteren Kreise sind in äquidistanten Abständen dazwischen platziert. Von diesem Datensatz werden daraufhin für drei verschiedene Szenarien, welche im nächsten Absatz beschrieben werden, synthetische Projektionsdatensätze im Winkelbereich $[0^\circ, 360^\circ)$ in 4800 äquidistanten Schritten erzeugt. Diese werden jeweils mit dem FBP Algorithmus der quelloffenen Software IMOD rekonstruiert [120, 132]. Der FBP Algorithmus gehört in der Praxis zu den am häufigsten genutzten Verfahren und wird bei SLOT standardmäßig eingesetzt [82, 144, 187].

Als erster Spezialfall wird zur Validierung des Projektionsalgorithmus eine parallele Strahlgeometrie ohne Kapillare simuliert. Dazu wird $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}} = n_{\text{kap}} = 1,339$ vorgegeben. Das Ergebnis der Rekonstruktion entspricht im Rahmen der numerischen Genauigkeit dem originalen Datensatz (siehe Abb. 3.5 A auf Seite 27). Weiterhin werden die Spezialfälle $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ und $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ mit den Parametern aus Tabelle 3.1 simuliert und rekonstruiert (siehe Abb. 3.5 B, C auf Seite 27). Für beide Fälle sind an der inneren Grenzfläche der Kapillare deutliche Artefakte zu erkennen, welche zur Mitte hin abnehmen und praktisch verschwinden. Die Artefakte sind für den Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ an jeder Position stärker als für den Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$. Dies ist durch den höheren Winkelversatz im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ begründet. Neben den deutlich erkennbaren Artefakten tritt im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ auch eine isotrope Skalierung mit dem Faktor $n_{\text{med}}/n_{\text{bad}} \neq 1$ auf.

Die zuvor durchgeführten Simulationen bezüglich der Rekonstruktionsartefakte gelten nicht nur für die Kreise mit den verwendeten Durchmesser. Da die Strahlverläufe invariant gegenüber einer isotropen Skalierung sind, treten die gleichen Artefakte für alle Kreise beliebiger Größe auf, sofern sie die gleichen Positionen relativ zum Innenradius der Kapillare haben. Die gezeigten Artefakte treten demnach in analoger Form auch für beliebig kleine Kreise auf. Darum beschreibt Abbildung 3.5 auch näherungsweise die Form der Artefakte für diskrete Punkte, aus denen der originale Datensatz zusammengesetzt ist.

Die zuvor beschriebene Analyse der Gestalt der Rekonstruktionsartefakte wurde am Beispiel des FBP Algorithmus durchgeführt. Zwar ist dies einer der am häufigsten eingesetzten Algorithmen, jedoch gibt es eine Vielzahl weiterer Rekonstruktionsalgorithmen, die in der Praxis Verwendung finden (vgl. Abschnitt 2.3). Im folgenden soll kurz untersucht werden, ob der Rekonstruktionsalgorithmus selbst einen Einfluss auf die Gestalt der Artefakte hat. Als zugrundeliegendes Originalbild wurde das Shepp-Logan Phantom mit 512×512 Pixeln verwendet (siehe Abb. 3.6 A). Das Shepp-Logan Phantom ist ein synthetischer Datensatz, welcher häufig zur Beurteilung von Rekonstruktionsalgorithmen in der Computertomographie verwendet wird [172, 187]. Die Projektion des Phantoms wird mit 800 Winkelschritten für eine volle Rotation durch eine Glaskapillare im Spezialfall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ simuliert. Zur Rekonstruktion der Projektionsdatensätze werden der FBP Algorithmus und der SART Algorithmus mit TV-Regularisierung angewendet (vgl. Abschnitt 2.3). Dafür werden die Implementationen der Algorithmen des quelloffenen Softwarepakets

Einfluss des Rekonstruktionsalgorithmus auf Artefakte

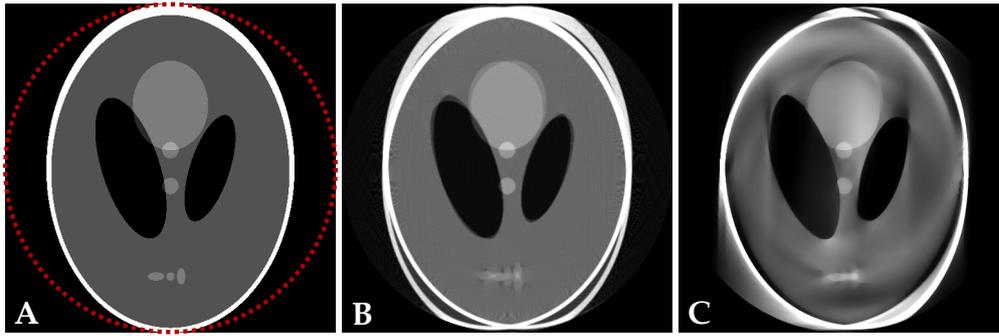


Abbildung 3.6: Einfluss des Rekonstruktionsalgorithmus auf die Gestalt von Artefakten durch Lichtbrechung. **A** Das Originalbild (Shepp-Logan Phantom) mit 512×512 Pixeln. Die innere Wand der Glaskapillare ist gestrichelt angedeutet (Innenradius $r_i = 0,8$ mm). Dieses Bild wurde für den Spezialfall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ für eine volle Umdrehung projiziert und anschließend rekonstruiert: **B** Rekonstruktion mit dem FBP Algorithmus und **C** mit dem SART Algorithmus mit TV Minimierung. Für die Darstellung sind alle Bilder auf die gleiche Größe skaliert, sodass der Einfluss der radialen Skalierung nicht sichtbar ist.

OpenRecon in OCTAVE verwendet [168]. Die Ergebnisse dieser Rekonstruktionen sind in Abb. 3.6 dargestellt. Anhand dieser Beispiele lässt sich feststellen, dass beide Algorithmen zu Artefakten aufgrund von Lichtbrechung führen. Der Grund dafür ist, dass beide Algorithmen eine parallele Strahlgeometrie voraussetzen. Bei der Rekonstruktion von verzerrten Projektionen müssen die Ergebnisse also fehlerhaft sein, wie zuvor schon erklärt wurde. Die Gestalt dieser Artefakte ist jedoch für beide Algorithmen unterschiedlich. Für diese Unterschiede gibt es zwei Ursachen: Erstens handelt es sich um zwei verschiedene Klassen von Algorithmen zur Inversion der Radon-Transformation. Beim FBP Algorithmus handelt es sich um einen direkten Rekonstruktionsalgorithmus, welcher als zentrale Operationen eine Fouriertransformation, Filterung und Rückprojektion des Sinogramms in den Bildraum nutzt [187]. Beim SART Algorithmus handelt es sich um ein iteratives Lösungsverfahren, welches die Radon-Transformation als ein lineares Gleichungssystem betrachtet und durch eine Reihe von Orthogonalprojektionen auf Hyperebenen dieses Gleichungssystems invertiert [6, 61]. Die Algorithmen verwenden also unterschiedliche Rechenoperationen zum Finden einer Lösung für einen gegebenen Projektionsdatensatz. Dies ist ein Grund für die unterschiedliche Ausprägung der Artefakte aufgrund von Lichtbrechung. Der zweite und wichtigere Grund ist, dass für den verwendeten SART Algorithmus zusätzlich eine TV-Minimierung der Lösung gefordert wird. Während der FBP Algorithmus näherungsweise eine Lösung für die inverse Radon-Transformation mit minimaler ℓ_2 -Norm sucht, strebt der verwendete SART Algorithmus gegen eine Lösung mit minimaler TV-Norm (vgl. Abschnitt 2.3). Damit ergeben sich verschiedene Lösungen und auch unterschiedliche Artefakte bei verzerrten Projektionen. Für ideale Projektionsdaten ohne Lichtbrechung liefern die Algorithmen praktisch identische Ergebnisse. Für spezielle Proben oder auch im Fall von starker Unterabtastung des Winkelbereichs bei den Projektionen liefert der SART Algorithmus mit TV-Minimierung jedoch deutlich bessere Resultate [26, 197].

Algorithmus 3.1 : Sinogramm-Entzerrung**Input** : Mit Lichtbrechung gemessener Projektionsdatensatz: $M(\rho, \theta)$ **Output** : Sinogramm wie aus Parallelprojektionen: $R(\rho, \theta)$

-
- 1 Erstelle leeren Datensatz $R(\rho, \theta)$ mit gleichen Dimensionen wie beim gemessenen Datensatz $M(\rho, \theta)$
 - 2 **foreach** *Indices* ρ, θ **do**
 - 3 Finde Strahl $L'(\rho', \theta')$ im Inneren der Kapillare mit $(\rho', \theta') = (\rho, \theta)$
 - 4 $R(\rho', \theta') \leftarrow M(\rho, \theta)$
-

3.3 SINOGRAMM-ENTZERRUNG ZUR KORREKTUR VON BILDARTEFAKTEN

Die Sinogramm-Entzerrung ist ein in dieser Arbeit entwickelter Algorithmus zur Korrektur von Rekonstruktionsartefakten aufgrund von Lichtbrechung. Der Grundgedanke für den Algorithmus ergibt sich aus den Überlegungen der vorigen Abschnitte, insbesondere den Gleichungen 3.1, 3.2 und 3.7.

Rekonstruktionsartefakte treten aufgrund der Tatsache auf, dass die gemessenen Projektionsdaten gegenüber einer Parallelprojektion verzerrt sind. Die Verzerrung entsteht durch die Änderung der Richtung der beleuchtenden Nadelstrahlen durch Lichtbrechung. An den Koordinaten (ρ, θ) im gemessenen Projektionsdatensatz findet sich der Wert des Integrals, welches zum Strahl (ρ', θ') im Inneren der Kapillare gehört. Der Zusammenhang zwischen (ρ, θ) und (ρ', θ') ist durch das Brechungsgesetz gegeben. Damit ist es möglich, jedem Punkt (ρ, θ) im Sinogramm den korrekten Integralwert zuzuordnen, indem die Koordinaten (ρ', θ') bestimmt werden, für die $(\rho', \theta') = (\rho, \theta)$ und der entsprechende Wert eingesetzt wird. Grundsätzlich entspricht dieses Vorgehen einer Neusortierung der gemessenen Projektionsdaten. Dadurch werden die Effekte der Lichtbrechung aus den Projektionsdaten beseitigt. Es entsteht ein äquivalentes Sinogramm, das einer Parallelprojektion entspricht. Dieses Sinogramm kann mit einem Rekonstruktionsalgorithmus für parallelen Strahleinfall rekonstruiert werden. Das Prinzip der Neusortierung von Messdaten vor der Rekonstruktion geht auf die Anfänge der Computertomographie zurück und wurde bereits zur Rekonstruktion bei Fächergeometrien eingesetzt [102]. Aufgrund der sphärischen Form der Kapillare ergibt sich im betrachteten Szenario jedoch keine Fächergeometrie für die beleuchtenden Nadelstrahlen.

Das oben beschriebene Vorgehen zur Neusortierung eines gemessenen Projektionsdatensatzes zu einem Sinogramm ist in Algorithmus 3.1 in Pseudocode dargestellt. Die Berechnung der Koordinaten des gesuchten Strahls innerhalb der Kapillare (Zeile 3 des Algorithmus) erfolgt nach Gleichungen 3.1–3.3. Die Zuordnung der Messwerte in das entzerrte Sinogramm in Zeile 4 des Algorithmus erfolgt mit einer bilinearen Interpolation.

Im vorangegangenen Abschnitt ist bereits erklärt worden, dass die Brechung zu zwei Effekten auf die Trajektorie von Punkten in den Projektionsdatensätzen führt. Erstens tritt eine konstante Skalierung der Trajektorien auf und zweitens ein Winkelversatz in θ -Richtung. Die radiale Skalierung ist zwar formal betrachtet ein Artefakt der Lichtbrechung, sie hat aber nur den Effekt einer isotropen Skalierung des rekonstruierten Bildes. In diesem Sinne führt die ra-

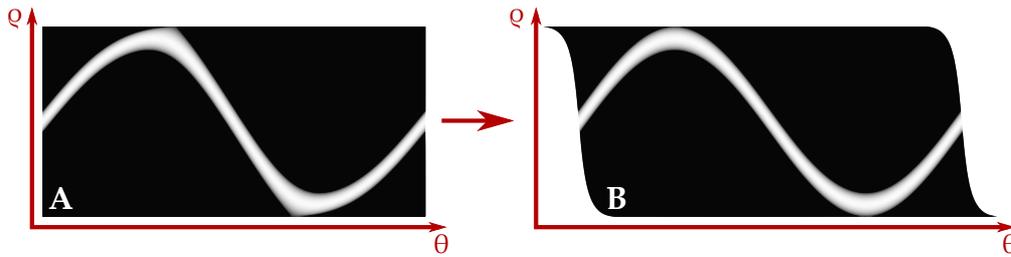


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Sinogramm-Entzerrung. Durch Neusortierung der gemessenen Projektionsdaten ergibt sich ein Sinogramm, als sei es mit einer Parallelprojektion aufgenommen worden. Eine Skalierung des Sinogramms in radiale Richtung führt nicht zu Bildfehlern in der Rekonstruktion und wird in dieser schematischen Darstellung vernachlässigt. **A** Gemessene Projektionsdaten für einen Kreis, der die Innenwand der Kapillare berührt (vgl. Abb. 3.5 A, B). An den Umkehrpunkten ist die Verzerrung der Trajektorie erkennbar. **B** Die Korrektur des Winkelversatzes entzerzt die Trajektorie durch Verschiebung der Zeilen des Sinogramms in θ -Richtung, sodass sich ein sinusförmiger Verlauf ergibt.

diale Skalierung nicht zu Bildfehlern, wenn der Effekt der Skalierung bei der Abtastung der Projektionen und der Auswertung der rekonstruierten Daten beachtet wird. Von einem Betrachter als Bildfehler erkennbare Artefakte ergeben sich nur durch den Winkelversatz in θ -Richtung. Die Korrektur des Winkelversatzes durch die Neusortierung ist in Abb. 3.7 illustriert und gibt der Sinogramm-Entzerrung ihren Namen. Durch die Neusortierung kompensiert die Sinogramm-Entzerrung sowohl die Effekte der Skalierung als auch des Winkelversatzes. Für die Auswertung von Messdaten in SLOT werden die gemessenen Projektionsdaten zunächst mit diesem Algorithmus vorprozessiert, um die Effekte der Lichtbrechung zu entfernen. Im nächsten Schritt der Prozesskette können die Daten wie Parallelprojektionen rekonstruiert werden.

3.4 VALIDIERUNG DER SINOGRAMM-ENTZERRUNG ZUR *in vitro* BILDGEBUNG IN SLOT

Um zu zeigen, dass mit Hilfe der Sinogramm-Entzerrung eine *in vitro* Bildgebung von Zellaggregaten in SLOT ermöglicht wird, wurde das nachfolgende Experiment realisiert. Als Probe wurden Aggregate aus humanen pluripotenten Stammzellen verwendet. Diese wurden durch Kooperationspartner an den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (Arbeitsbereich Molekulare Biotechnologie und Stammzellforschung, AG Zweigerdt) zur Verfügung gestellt [204] und an das Laser Zentrum Hannover überführt. Daraufhin wurden die Zellaggregate in ein 0,8% Agarosegel („low melting“) auf Basis des verwendeten Zellkulturmediums mTeSR eingebettet und in eine Glaskapillare gesogen. Diese wurde anschließend mit Dentalwachs versiegelt. Die Eigenschaften der Glaskapillare und des Kulturmediums sind in Tabelle 3.1 auf Seite 23 angegeben. Alle bereits gezeigten numerischen Simulationen legen ebenfalls diese Parameter für die Radien der Kapillare sowie die Brechungsindizes von Kapillare und Medium zugrunde.

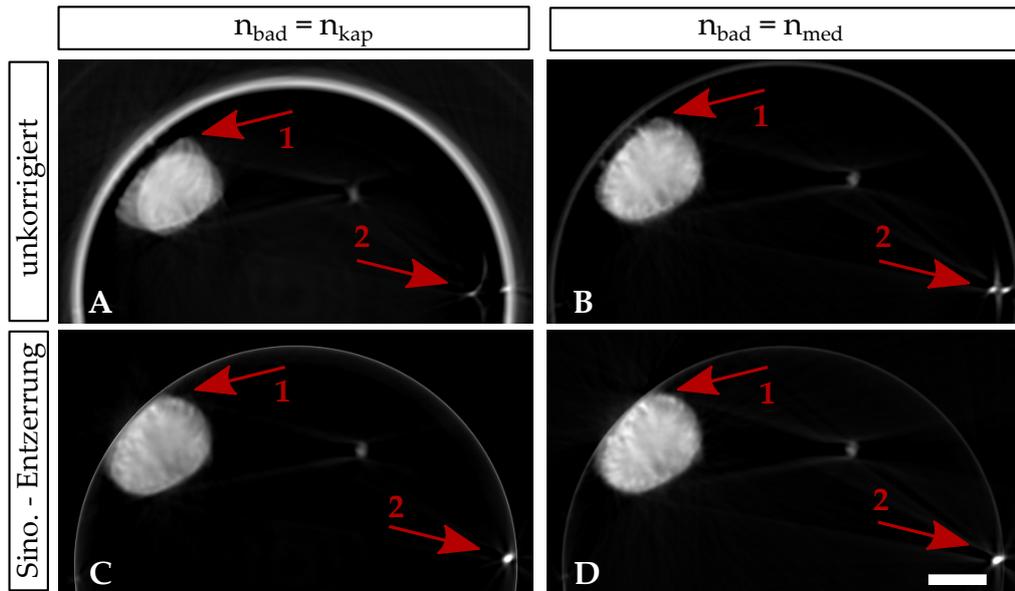


Abbildung 3.8: Experimentelle Validierung der Sinogramm-Entzerrung in einer Ebene (modifiziert nach [8]). Gezeigt sind Rekonstruktionen von Zellaggregaten in einer Glaskapillare mit SLOT. Dabei sind die beiden in diesem Kapitel diskutierten Spezialfälle für das Bad reproduziert worden. **A**, **B** Rekonstruktion der verzerrten Projektionsdaten. An den markierten Stellen sind Artefakte zu erkennen, die durch Lichtbrechung verursacht sind. Pfeil **1** zeigt auf den Rand eines Zellaggregats nahe der Innenwand der Kapillare. Die auftretenden Bildfehler sind den Artefakten in den simulierten Datensätzen aus Abb. 3.5 sehr ähnlich. Pfeil **2** zeigt auf ein sehr kleines Zellaggregat in großer Nähe zur Innenwand. Hier erwecken die fehlerhaft rekonstruierten Datensätze den Eindruck, dass es sich um zwei Objekte handele. **C**, **D** Rekonstruktion nach vorheriger Sinogramm-Entzerrung. Die zuvor beobachteten Artefakte verschwinden. Skalenbalken $200\mu\text{m}$.

*Experimente mit
Lichtbrechung an der
Glaskapillare*

AP 150 Wacker
Sigma-Aldrich, USA

AR 20
Sigma-Aldrich

Bei der Bildgebung SLOT wurden die zwei exemplarisch diskutierten Spezialfälle $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ und $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ experimentell umgesetzt. Für den ersten Fall wurde zur Brechungsindexanpassung der Kapillare ein Gemisch aus zwei Silikonölen (AP 150 Wacker und AR 20) mit einem Brechungsindex von $n = 1,486$ angefertigt. Anschließend wurde dieses als Bad in die Küvette des Aufbaus gegeben. Für den zweiten Fall wurde die Küvette mit mTeSR Medium gefüllt. In beiden Fällen wurde die Glaskapillare an der Rotationsachse des SLOT Aufbaus montiert und so justiert, dass ihre Symmetrieachse mit der Rotationsachse des Aufbaus übereinstimmte. Weil das primäre Ziel die Validierung der Sinogramm-Entzerrung darstellte, wurden die Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt statt bei Inkubationstemperatur. Die numerische Apertur des abbildenden Systems wurde mit dem motorisierten Zoomlinsensystem als $NA = 0,027$ eingestellt und war so gewählt, dass der gesamte Durchmesser der Kapillare im Bereich der Schärfentiefe lag. Somit entsprach die theoretische optische Auflösung etwa $\Delta x = 12\mu\text{m}$. Die Projektionen wurden mit einem Pixelabstand von ca. $3,2\mu\text{m}$ in beide Raumrichtungen mit einer Dimension von 1000×500 Pixeln aufgenommen. Die vom Nyquist

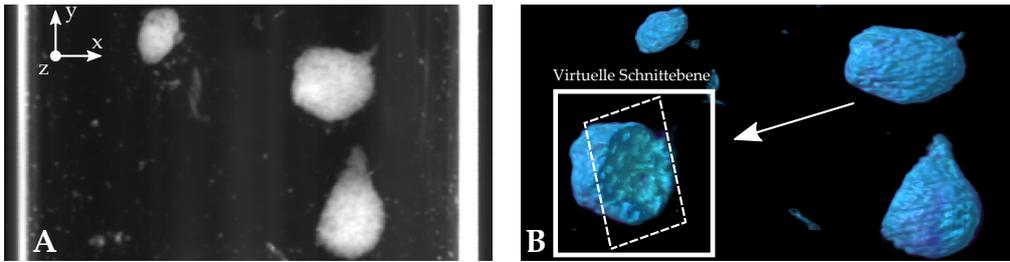


Abbildung 3.9: Artefaktfreie Rekonstruktion von volumetrischen Datensätzen mit Sinogramm-Entzerrung (modifiziert nach [8]). **A** Einzelnes Projektionsbild durch die Glaskapillare mit einer Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare. Seitlich sind Reflexionen an der inneren Grenzfläche der Kapillare zu erkennen. **B** Dreidimensionales Rendering der tomographischen Daten nach der Sinogramm-Entzerrung und anschließender tomographischer Rekonstruktion mit dem FBP Algorithmus. Die Daten erlauben die volumetrische Analyse und die Platzierung virtueller Schnitte in beliebigen Ebenen.

Theorem geforderte Abtastung wurde somit um circa das zweifache übertroffen. Eine volle Drehung der Kapillare wurde in 1000 Winkelschritten durchgeführt. Zur Beleuchtung wurde ein cw-Lasermodul (30mw532) mit 532 nm Zentralwellenlänge verwendet. Durch einen optischen Bandpassfilter (520/35 nm, FF01-520/35-25) wurde das Streusignal der Zellaggregate detektiert. Die so gemessenen Rohdaten wurden mit der in SLOT üblichen Vorprozessierung verarbeitet, wie von Heidrich beschrieben [82]. Insbesondere wurde dabei der Zeilenversatz (Interlace) entfernt sowie ein lateraler Versatz (entlang der x-Achse) der Rotationsachse numerisch korrigiert. Diese Schritte haben keinen Einfluss auf die Verzerrung des Sinogramms durch die Lichtbrechung.

Die Validierung der Sinogramm-Entzerrung wurde zunächst an einer einzelnen Ebene senkrecht zur Rotationsachse vorgenommen. Dazu wurde in beiden Datensätzen im Rahmen der Messgenauigkeit dieselbe Ebene identifiziert. Die entsprechenden, durch Lichtbrechung verzerrten Projektionsdatensätze wurden daraufhin zunächst mit dem FBP Algorithmus rekonstruiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 A, B dargestellt. Tatsächlich sind in beiden Fällen Bildfehler zu erkennen, welche den Artefakten an synthetischen Datensätzen stark ähneln (vgl. auch Abb. 3.5). Wie erwartet, sind die Artefakte für den Fall der Brechungsindexanpassung der Kapillare ($n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$) deutlich stärker ausgeprägt. In einem zweiten Schritt wurden die Projektionsdaten zunächst mit der Sinogramm-Entzerrung bearbeitet und dann nochmals mit dem FBP Algorithmus rekonstruiert. Die zuvor beobachteten Artefakte verschwinden und die rekonstruierten tomographischen Datensätze sind im Rahmen der experimentellen Genauigkeit gleich (siehe Abb. 3.8 C, D). Die Sinogramm-Entzerrung ist folglich in der Lage, auch für reale Messdaten die durch Lichtbrechung verursachten Artefakte zu korrigieren.

Wie zu Beginn von Abschnitt 3.2.1 erläutert, sind die Strahlverläufe in allen Ebenen senkrecht zur Rotationsachse identisch. Die Sinogramm-Entzerrung kann also ebenenweise auf einen kompletten Projektionsdatensatz angewendet werden. Dieser Projektionsdatensatz kann anschließend zu einem dreidimensionalen tomographischen Datensatz rekonstruiert werden. Diese Schritt

30mw532
insaneware, Deutschland
FF01-520/35-25
520/35 nm BrightLine®
single-band bandpass
filter, Semrock, USA

*Sinogramm-Entzerrung an
einer einzelnen Ebene*

*Sinogramm-Entzerrung
zur volumetrischen
Rekonstruktion*

te wurden exemplarisch für einen Datensatz durchgeführt, der für den Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$ aufgenommen wurde. In Abb. 3.9 ist dieses Ergebnis in Form eines dreidimensionalen Renderings dargestellt. Die rekonstruierten tomographischen Daten erlauben beispielsweise die quantitative Analyse der Form, Position und des Volumens der Zellaggregate. Weiterhin können virtuelle histologische Schnitte in beliebigen Raumrichtungen innerhalb der Probe platziert werden.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES KAPITELS

In diesem Kapitel wurde die Sinogramm-Entzerrung zur Korrektur von Bildartefakten aufgrund von Lichtbrechung in SLOT vorgestellt. Konkret wurde die Lichtbrechung, die durch Halterung von *in vitro* Kulturen in einer Glaskapillare auftritt, untersucht und die daraus resultierenden Artefakte in den rekonstruierten Daten korrigiert.

Das Problem der Strahlabbreitung in der Kapillare konnte durch geometrische Optik beschrieben und auf zwei Dimensionen reduziert werden. So wurde zunächst die Brechung in einer einzelnen Ebene senkrecht zur Symmetrieachse der Kapillare untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass für jeden Strahl durch die Brechung an den Grenzflächen zwei Effekte auftreten: Erstens hat der ins Innere der Kapillare gebrochene Strahl einen Winkelversatz gegenüber dem einfallenden Strahl. Dieser hängt auf nicht triviale Weise von den Radien der Kapillare und den Brechungsindizes von Bad, Kapillare und Medium ab. Zweitens erfährt der Strahl eine radiale Skalierung proportional zum Quotienten der Brechungsindizes von Bad und Medium.

Bei einer idealen Parallelprojektion durchläuft jeder Bildpunkt in einer Ebene in den Projektionsdaten eine Sinuskurve. Es wurde gezeigt, dass diese Trajektorie durch den Winkelversatz aufgrund von Lichtbrechung verzerrt wird. Üblicherweise nimmt die Stärke der Verzerrung dabei für Punkte nahe der Innenwand der Kapillare zu. Diese Verzerrung der Trajektorie wurde anhand von numerischen Simulationen analysiert. Dazu wurden zwei exemplarische Spezialfälle für das Badfluid ausführlich untersucht. Dies sind erstens die Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare ($n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$) und zweitens die Verwendung des Zellkulturmediums als Bad ($n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$). Durch theoretische Berechnungen wurde nachgewiesen, dass die Verzerrung im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ stets kleiner ist als im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$. Es wurde begründet, dass die Verzerrung der Trajektorie durch die Lichtbrechung die Ursache für die Bildartefakte in den rekonstruierten Daten ist. Diese Artefakte wurden simuliert und bezüglich ihrer Gestalt analysiert. In Übereinstimmung mit der Erwartung sind die Bildartefakte im Fall $n_{\text{bad}} = n_{\text{med}}$ weniger stark ausgeprägt als für eine Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare. Durch den Vergleich des FBP mit dem SART Algorithmus konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Rekonstruktionsalgorithmus selbst einen Einfluss auf die Gestalt der Artefakte besitzt. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass die beiden Algorithmen mathematisch betrachtet verschiedene Lösungen für das Problem der Radon-Inversion liefern.

Zur Korrektur der Artefakte durch Lichtbrechung wurde ein Algorithmus zur Sinogramm-Entzerrung entwickelt. Basierend auf den Erkenntnissen aus

Theorie und Simulation findet dort eine Umordnung der Projektionsdaten statt. Nach dieser Umordnung liegen die Projektionsdaten so vor, als seien sie mit einer parallelen Strahlgeometrie aufgenommen worden und können daher von tomographischen Rekonstruktionsalgorithmen erfolgreich verarbeitet werden. Die Sinogramm-Entzerrung ist demnach ein Schritt zur Vorprozessierung der SLOT Messdaten.

Abschließend wurde gezeigt, dass mit der Sinogramm-Entzerrung eine *in vitro* Bildgebung von Zellaggregaten innerhalb einer versiegelten Glaskapillare in SLOT ermöglicht wird. Die Zellen wurden in einem Agarose-Gel immobilisiert und befinden sich in der Glaskapillare. In zwei Experimenten wurde einerseits die Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare durchgeführt und andererseits die Verwendung des Zellkulturmediums als Bad. In beiden Fällen konnten die durch Lichtbrechung bedingten Artefakte aus den Daten erfolgreich beseitigt werden und damit volumetrische tomographische Datensätze erstellt werden.

Teil II

DIGITALE HOLOGRAPHIE

DIESES Kapitel gibt eine Einführung in die Theorie und Methoden der digitalen Holographie. Die Wissensinhalte sind Aufsätzen und Lehrbüchern entnommen, die an entsprechender Stelle zitiert werden. In Abschnitt 4.1 werden zunächst die grundlegenden Prinzipien der digitalen Holographie erörtert und verschiedene Konzepte zur experimentellen Realisierung vorgestellt. Insbesondere wird auf die digitale Rekonstruktion von Phaseninformationen aus interferometrischen Messdaten eingegangen. Ein wesentlicher Teilschritt dieser Rekonstruktion, das sogenannte Phase Unwrapping, nimmt in dieser Arbeit eine besondere Rolle ein und wird in Abschnitt 4.2 vertieft. Die Analyse der Messwerte aus der digitalen Holographie ist essentiell für das nachfolgende Kapitel 5, aber oft nicht intuitiv. Daher wird zum Abschluss des Kapitels in Abschnitt 4.3 auch die biophysikalische Bedeutung der Verzerrung einer Lichtwelle nach der Durchquerung einer Zelle erklärt.

4.1 MESSPRINZIP UND DIGITALE REKONSTRUKTION

In diesem Abschnitt wird zuerst ein kurzer Überblick über verschiedene Messparadigmen der digitalen Holographie gegeben. Abschließend werden die Schritte zur Rekonstruktion von quantitativer Phaseninformation aus interferometrischen Messdaten vorgestellt. Die Beschreibung der formalen Zusammenhänge orientiert sich an [117],[147] und [55]. Für eine detaillierte Darstellung wird auf diese Werke verwiesen.

4.1.1 Prinzip der digitalen Holographie

Als Holographie wird das Prinzip bezeichnet, aus der Messung eines Interferenzmusters die Phase und Amplitude einer Wellenfront zu rekonstruieren [117]. Dazu wird das Interferenzmuster einer bekannten Referenzwelle mit einer Objektwelle, welche durch Lichtausbreitung in dem zu untersuchenden Objekt verursacht ist, auf einem Detektor aufgezeichnet. Für die Rekonstruktion wird das aufgezeichnete Interferenzbild mit der Referenzwelle beleuchtet und so die Amplituden und Phasenverteilung der Objektwelle rekonstruiert. Dies ist das ursprünglich von Gabor entwickelte Prinzip [63]. Heutzutage wird der Begriff der Holographie weiter gefasst und schließt zusätzliche Bildgebungstechniken ein, die zugleich Amplitude und Phase einer Lichtwelle vermessen können [117, 147]. In der digitalen Holographie erfolgen die Detektion und Rekonstruktion mit Hilfe eines Computers.

Seien das komplexwertige elektrische Feld einer bekannten Referenzwelle mit $E_R(\vec{x}) = A_R(\vec{x}) \cdot e^{i\phi_R(\vec{x})}$ und einer zunächst unbekanntem Objektwelle mit $E_O(\vec{x}) = A_O(\vec{x}) \cdot e^{i\phi_O(\vec{x})}$ bezeichnet, wobei die reellwertigen Amplituden

*Physikalische Grundlagen
der Holographie*

*Bildentstehung und
Rekonstruktion*

und Phasen durch $A_{R,O}(\vec{x})$ bzw. $\phi_{R,O}(\vec{x})$ gegeben sind. Dann ergibt sich für das resultierende Interferogramm eine Helligkeitsverteilung gemäß:

$$\begin{aligned} u(\vec{x}) &= |E_R(\vec{x}) + E_O(\vec{x})|^2 \\ &= |E_R|^2 + |E_O|^2 + E_R^* E_O + E_R E_O^* \\ &= A_R^2 + A_O^2 + 2A_R A_O \cdot \cos(\phi_O - \phi_R) \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$= \underbrace{A_R^2 + A_O^2}_{0. \text{ Ordnung}} + \underbrace{A_R A_O \cdot e^{i(\phi_O - \phi_R)}}_{+1. \text{ Ordnung}} + \underbrace{A_R A_O \cdot e^{-i(\phi_O - \phi_R)}}_{-1. \text{ Ordnung}}. \quad (4.2)$$

Das Interferogramm ist die Summe dreier Terme, die in Analogie zur Beugung am Gitter als Interferenzterme 0. und ± 1 . Ordnung bezeichnet werden. Der Interferenzterm 0. Ordnung ist die inkohärente Überlagerung der Helligkeitsverteilungen der Wellen. Die Terme erster Ordnung enthalten die Amplituden- und Phaseninformation von Referenz- und Objektwelle. Wird diese reellwertige Amplitudenverteilung mit der bekannten komplexen Wellenfront der Referenzwelle in der Sensorebene multipliziert, ergibt sich:

$$\begin{aligned} u(\vec{x}) \cdot E_R(\vec{x}) &= |E_R(\vec{x}) + E_O(\vec{x})|^2 \cdot E_R(\vec{x}) \\ &= \underbrace{(|E_R|^2 + |E_O|^2) \cdot E_R}_{0. \text{ Ordnung}} + \underbrace{|E_R|^2 \cdot E_O}_{1. \text{ Ordnung}} + \underbrace{E_R^2 \cdot E_O^*}_{-1. \text{ Ordnung}}. \end{aligned} \quad (4.3)$$

Diese Gleichung ist die Basis für viele Rekonstruktionsverfahren der digitalen Holographie [117]. Diese Multiplikation wird in der digitalen Holographie numerisch durchgeführt. Der Term 0. Ordnung in Gleichung 4.3 entspricht der Referenzwelle mit einem reellen Faktor skaliert. Der Term erster Ordnung ist proportional zu der Objektwelle. Der Term -1 . Ordnung wird als Zwillingsbild (engl. *twin image*) bezeichnet, da er in der herkömmlichen Holographie ein weiteres identisches Bild des Objekts produziert. Er besitzt die gleiche Information wie der Interferenzterm 1. Ordnung. Die Überlagerung dieser drei Terme erschwert eine fehlerfreie Rekonstruktion der Objektwelle, sodass verschiedene Messkonfigurationen entwickelt wurden, um die Interferenzterme voneinander zu trennen [117].

Konfigurationen zur
Trennung der
Interferenzterme

Ein Messprinzip, welches eine Trennung der Interferenzordnungen ermöglicht, ist die sogenannte off-axis Aufnahme. Dabei werden die Referenz- und die Objektwelle um einen Winkel gegeneinander verkippt, sodass auch ohne Objekt ein Interferenzmuster entsteht (vgl. Abb. 4.2 A auf Seite 43). Der durch diese Verkipfung erzeugte Phasenversatz wirkt als Trägerfrequenz, die eine Rekonstruktion der Objektphase durch Demodulation ermöglicht, wie später in Abschnitt 4.1.2 beschrieben. Im Folgenden wird eine Auswahl an off-axis Konfigurationen dargestellt, für eine Vielzahl anderer Konfigurationen wird auf die Literatur verwiesen [138, 145, 117, 173]. Bei der Mach-Zehnder Konfiguration wird der Beleuchtungsstrahl aufgespalten in einen Strahl, welcher die Probe passiert sowie einen Referenzstrahl (siehe Abb. 4.1 B). Diese Strahlen werden verkippt überlagert und das Interferogramm wird detektiert. In dieser Arbeit wird eine Konfiguration nach Kemper *et al.* [115] verwendet (siehe Abb. 4.1 C). Diese Konfiguration benötigt keinen separat geführten Referenzstrahl, sondern bringt den Beleuchtungsstrahl nach Durchgang durch

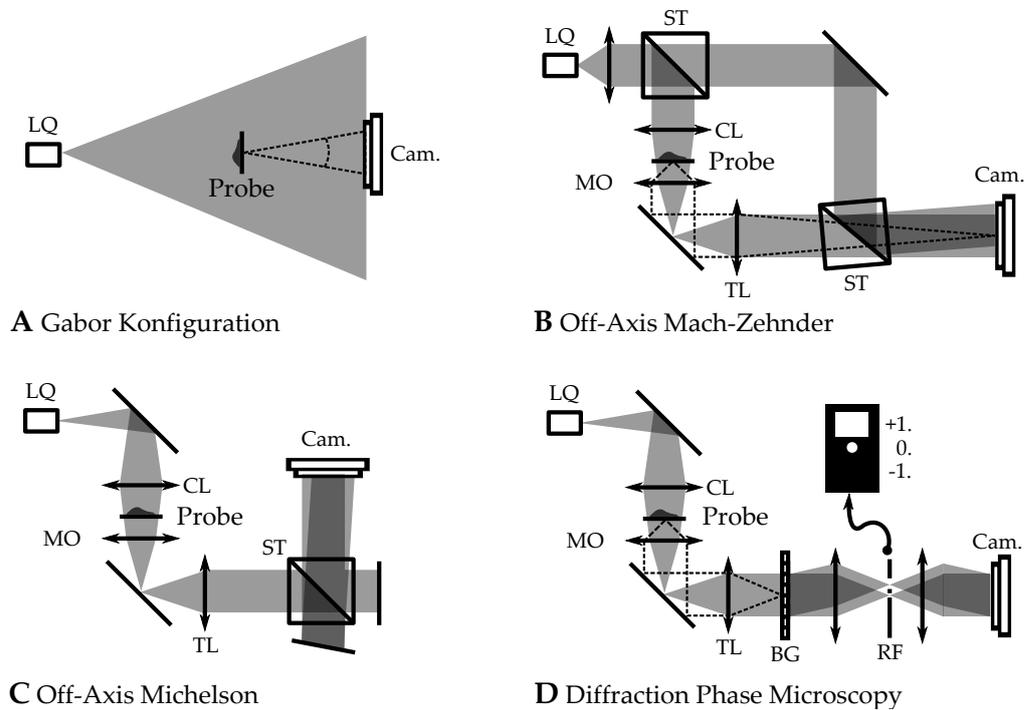


Abbildung 4.1: Verschiedene Konfigurationen der digital holographischen Bildgebung. **A** On-axis oder Gabor Konfiguration (vgl. [147]). Es interferieren die Kugelwelle der punktförmigen Lichtquelle mit den beim Durchgang durch das Objekt erzeugten Kugelwellen. Die Detektion erfolgt digital auf einem Kamerachip. **B** Off-axis Konfiguration mit Mach-Zehnder Interferometer (vgl. [147]). Durch eine Drehung des letzten Strahlteilers wird eine Verkippung von Objektwelle und Referenzwelle erreicht. **C** Off-axis Michelson Konfiguration nach Kemper *et.al.* [115]. Das Durchlicht wird in einem Michelson Interferometer in Proben- und Referenzstrahl aufgespalten, wobei der Referenzstrahl durch einen Spiegel verkippert wird. Das Bildfeld wird dabei so gewählt, dass sich die Probe nur im Objektstrahl befindet und der Referenzstrahl einen freien Bereich ohne Probe abbildet. **D** Diffraction Phase Microscopy nach Popescu (vgl. [16]). Das Durchlicht wird durch ein Beugungsgitter in nullte und erste Beugungsordnung gespalten, welche durch ein 4f-Linsensystem verkippert überlagert werden. Zuvor wird mit einem räumlichen Filter die nullte Beugungsordnung durch eine Lochblende gereinigt, während die erste Beugungsordnung ungehindert passiert. **Abkürzungen:** LQ: Lichtquelle, Cam.: Kamerachip, CL: Kondensorlinse, MO: Mikroskopobjektiv, TL: Tubuslinse, ST: Strahlteiler, BG: Beugungsgitter, RF: räumlicher Filter.

die Probe mit sich selbst zur Interferenz. Dabei werden die Spiegel in den Interferometerarmen gegeneinander verkippt, sodass erstens eine ausreichende Modulationsfrequenz eingebracht wird und zweitens die Probe mit einem freien Hintergrund überlagert wird. Dazu muss ein ausreichender Bereich des Bildfeldes frei von der zu messenden Probe sein. Diese Forderung ist bei der Diffraction Phase Microscopy [16] nicht nötig (siehe Abb. 4.1 D). Dort wird der durch die Probe transmittierte Strahl mit einem optischen Gitter in die 0. und ± 1 . Beugungsordnung aufgespalten und danach die 0. und 1. Beugungsordnung mit einer 4f-Abbildung verkippt überlagert. Dazu wird ein spezieller Filter im Fokus der 4f-Abbildung verwendet, der die -1 . Interferenzordnung blockt, die 1. Ordnung ungehindert passieren lässt und die 0. Ordnung durch eine Lochblende räumlich filtert.

Allen off-axis Konfigurationen ist gemein, dass sie die Bestimmung der komplexen Objektwellenfront aus einem einzelnen Interferogramm ermöglichen, allerdings auf Kosten einer beschränkten Bandbreite des Amplituden- und Phasensignals, siehe dazu Abschnitt 4.1.2. Ein alternatives Messprinzip der digitalen Holographie ohne diese Bandbreitenbeschränkung stellen sogenannte Phasenschrittverfahren dar [196]. Die Phase der Referenzwelle wird dafür inkrementell um definierte Schritte gegen die Phase der Objektwelle verschoben. Die Verschiebung muss in mindestens zwei Schritten erfolgen, üblicherweise werden drei oder vier definierte Schritte verwendet [117, 147, 193]. Durch die mehrfache Aufzeichnung der Interferogramme und die Einstellung des Phasenversatzes wird die zeitliche Aufnahmezeit des abbildenden Systems reduziert. Aus diesem Grund spielen diese Techniken in dieser Arbeit keine Rolle und werden hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

4.1.2 Berechnung der Phasenverteilung mit der Fourier-Transformations-Methode

Eine verbreitete Methode zur Berechnung einer Phasenverteilung aus einem einzelnen off-axis Interferogramm ist die von Takeda *et al.* in [185] beschriebene Fourier-Transformations-Methode [119, 167]. Eine der Interferenzordnungen wird durch Demodulation der Trägerfrequenz und anschließende Filterung aus einem Interferogramm rekonstruiert. Die Referenzwelle des Interferogramms soll dabei eine ebene Wellenfront mit bekannter Amplitudenverteilung besitzen, sodass insbesondere für den Phasenterm ohne Einschränkung $\phi_R(\vec{x}) \equiv 0$ angesetzt werden kann. Weiterhin wird vorausgesetzt, dass die Modulationsfrequenz des Streifenmusters höher ist als die räumlichen Variationen der Amplituden- und Phasenterme der Objekt- und Referenzwelle. Seien \vec{k}_O und \vec{k}_R die Wellenvektoren der Objekt- bzw. Referenzwelle und $\vec{K} = \vec{k}_O - \vec{k}_R$ der Differenzvektor. Dann lässt sich dieser Term aus der Phasenverteilung abspalten und die Helligkeitsverteilung des Interferenzmusters wird geschrieben als:

$$u(\vec{x}) = a(\vec{x}) + c(\vec{x}) \cdot e^{i\vec{K} \cdot \vec{x}} + c^*(\vec{x}) \cdot e^{-i\vec{K} \cdot \vec{x}} \quad (4.4)$$

$$\begin{aligned} a(\vec{x}) &:= A_R(\vec{x})^2 + A_O(\vec{x})^2 \\ c(\vec{x}) &:= A_R(\vec{x})A_O(\vec{x}) \cdot e^{i\phi_O(\vec{x})}. \end{aligned} \quad (4.5)$$

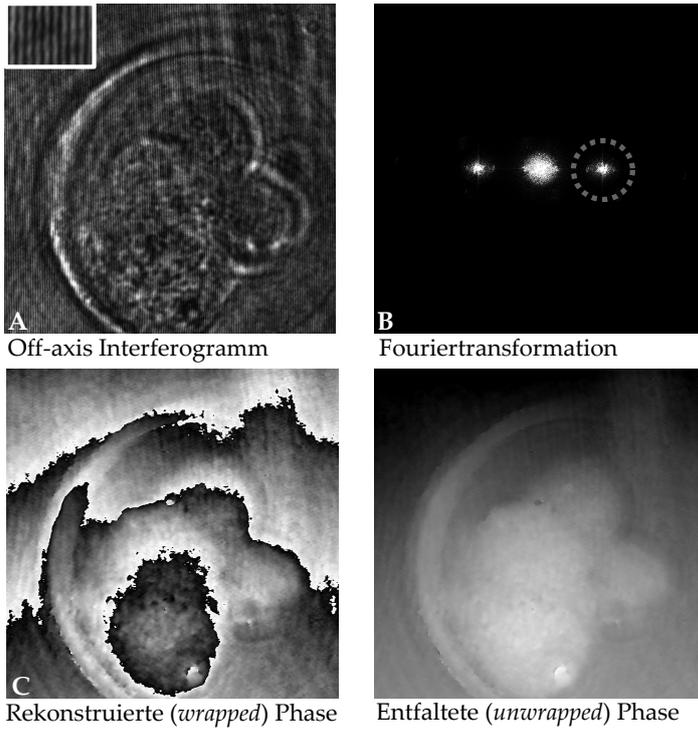


Abbildung 4.2: Phasenrekonstruktion mit der Fourier-Transformations-Methode. **A** Off-axis Interferogramm mit senkrechtem Streifenmuster durch Verkippung der Referenzwelle gegenüber der Objektwelle. Ein $5\times$ vergrößerter Ausschnitt zeigt die Interferenzstreifen. **B** Fourier-Transformation des Interferogramms. Die nullte Interferenzordnung ist in der Mitte zu erkennen, darum finden sich symmetrisch die ± 1 . Ordnungen (siehe Gl. 4.5). Die ± 1 . Ordnung wird durch Filterung ausgeschnitten und durch inverse Fourier-Transformation rekonstruiert. **C** Rekonstruierte Phasenverteilung der Objektwelle. Die Phase ist in das Intervall $[-\pi, \pi]$ umgebrochen (engl. *wrapped*). **D** Entfaltete Phase. Dazu wurde die rekonstruierte Phase durch einen Phase Unwrapping Algorithmus verstetigt (siehe Abschnitt 4.2).

An Gleichung 4.4 ist zu erkennen, dass die Verkippung der Wellenfronten zu einem $\vec{K} \neq \vec{0}$ führt und damit zu einer Trägerfrequenz. Dabei zeigt der Vektor \vec{K} senkrecht zu den Streifen des Interferenzmusters. Der Term $a(\vec{x})$ enthält die 0. Interferenzordnung, während $c(\vec{x})$ und das komplex konjugierte $c^*(\vec{x})$ die $+1$., bzw. -1 . Ordnung enthalten. Diese Ordnungen sind durch die Trägerfrequenz symmetrisch um die 0. Ordnung verschoben (vgl. Abb. 4.2 A,B). Im ersten Schritt wird die zweidimensionale Fourier-Transformation der Intensitätsverteilung des Interferenzmusters berechnet:

$$\begin{aligned} U(\vec{k}) &= \mathcal{F}\{u(\vec{x})\}(\vec{k}) = A(\vec{k}) + C(\vec{k} - \vec{K}) + C^*(\vec{k} + \vec{K}) \quad (4.6) \\ A(\vec{k}) &:= \mathcal{F}\{a(\vec{x})\}(\vec{k}) \\ C(\vec{k}) &:= \mathcal{F}\{c(\vec{x})\}(\vec{k}). \end{aligned}$$

Daraufhin wird das Zentrum der $+1$. Interferenzordnung zur Nullfrequenz verschoben und diese Verteilung durch einen radialsymmetrischen Heaviside

Filter $H(|\vec{k}|)$ aus der Fourier-Transformation U ausgeschnitten (siehe Abb. 4.2), formal:

$$C(\vec{k}) = H(|\vec{k}|) \cdot U(\vec{k} + \vec{K})$$

$$H(|\vec{k}|) = \begin{cases} 1 & ; |\vec{k}| < |\vec{K}|/2 \\ 0 & ; \text{sonst} \end{cases}$$

Die Verschiebung ist äquivalent mit der digitalen Beleuchtung des Interferogramms mit einer ebenen Referenzwellenfront $e^{i\vec{K} \cdot \vec{x}}$. Die Filterung in der Fourierdarstellung des Interferogramms ermöglicht eine selektive Auswahl der ersten Interferenzordnung. Sie ist unter der Voraussetzung möglich, dass die Bandbreite des Signals $c(\vec{x})$ kleiner als der Betrag der Trägerfrequenz ist. Aus diesem Grund wurde zuvor die Forderung gestellt, dass die Variation der Amplituden und Phasenterme mit niedrigerer Raumfrequenz als das Streifenmuster der Trägerfrequenz erfolgt [185]. Diese Forderung bedeutet eine Beschränkung der Bandbreite der rekonstruierten Amplituden- und Phasenverteilung. Anschließend wird durch eine inverse Fourier-Transformation $c(\vec{x}) = \mathcal{F}^{-1}\{C(\vec{k})\}(\vec{x})$ berechnet (siehe Gl. 4.5). Da die Amplituden und Phasenverteilung der Referenzwelle bekannt sind, werden daraus die Amplituden- und Phasenverteilung der Objektwelle wie folgt berechnet:

$$A_O(\vec{x}) = \frac{|c(\vec{x})|}{A_R(\vec{x})} \quad (4.7)$$

$$\phi_w(\vec{x}) = \tan^{-1} \left\{ \frac{\Im(c(\vec{x}))}{\Re(c(\vec{x}))} \right\}. \quad (4.8)$$

Dabei ist zu beachten, dass die rekonstruierte Phase der Objektwelle auf den prinzipiellen Wertebereich des Arkustangens von $[-\pi, \pi)$ umgebrochen ist. Dies ist nicht nur eine Eigenschaft dieser speziellen Rekonstruktionstechnik, sondern eine grundlegende Eigenschaft der Phasenrekonstruktion aus den Helligkeitsinformationen eines oder mehrerer Interferogramme. Grund dafür ist die Periodizität des Helligkeitsmusters bei Gangunterschieden von Vielfachen der Wellenlänge. Dieses Phänomen der Rekonstruktion wird als Phase Wrapping bezeichnet. Die umgebrochene Phase wird ϕ_w genannt. Die Phase ϕ_w ist nicht identisch mit der Phase ϕ_O , sondern zeigt charakteristische 2π Sprünge, wie schematisch in Abb. 4.3 dargestellt. Die Berechnung der Phase ϕ_O aus der Phase ϕ_w wird Phase Unwrapping genannt und stellt einen entscheidenden Rekonstruktionsschritt für viele Methoden der quantitativen Phasenbildung dar [147]. Die Grundlagen des Phase Unwrapping werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

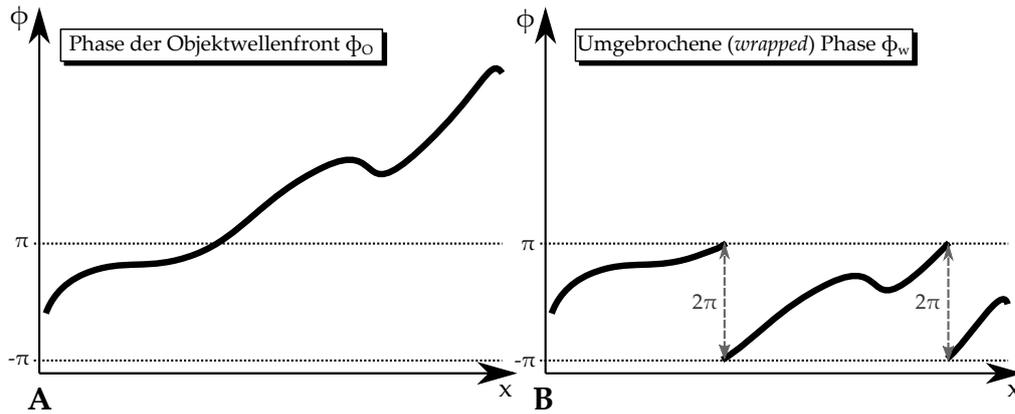


Abbildung 4.3: Illustration von entfalteter und umgebrochener Phase für einen ein-dimensionalen Fall. **A** Die stetige Phasenverteilung einer Objektwelle ϕ_0 . Diese kann nicht direkt aus einem Interferogramm berechnet werden. Stattdessen wird zunächst die **B** umgebrochene (engl. *wrapped*) Phase ϕ_w gewonnen. Diese besitzt einen Wertebereich im Intervall $[-\pi, \pi)$. Es ergeben sich charakteristische 2π Diskontinuitäten, die in der Abbildung mit gestrichelten Pfeilen markiert sind.

4.2 PHASE UNWRAPPING

Als Phase Unwrapping wird das Problem bezeichnet, aus einer Phasenverteilung, die in das Intervall $[-\pi, \pi)$ umgebrochen ist, die zugrundeliegende Phasenverteilung ohne Sprünge zu rekonstruieren. Dieses Problem tritt in Bildgebungstechniken wie der digitalen Holographie, der Radarinterferometrie [71] und der Magnetresonanztomographie [29] auf, bei denen die Phase eines komplexen physikalischen Signals gemessen wird. In diesem Abschnitt werden die mathematischen Grundlagen zum zweidimensionalen Phase Unwrapping behandelt sowie ein Überblick über die bestehenden Algorithmen gegeben. Insbesondere wird auf die kachelbasierten und die modellbasierten Algorithmen eingegangen, da sie für diese Arbeit von spezieller Bedeutung sind.

4.2.1 Mathematische Grundlagen

Eine zweidimensionale umgebrochene (engl. *wrapped*) Phasenverteilung sei gegeben und wird mit $\phi_w(x, y)$ bezeichnet. Die zugrundeliegende, wahre Phasenverteilung sei $\phi_u(x, y)$ und wird als entfaltete (engl. *unwrapped*) Phase bezeichnet. Die folgende Definition legt den Begriff der entfalteten Phase, wie er in dieser Arbeit verwendet wird, fest:

Definition 4.1. Eine Funktion $\phi(x, y) : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$, die auf einem diskreten Raster (x_i, y_j) gegeben ist, heißt *entfaltet*, wenn folgendes gilt:

Definition der entfalteten Phase

1. *Abwesenheit von Phasensprüngen:* $\phi(x, y)$ ist stückweise stetig und die Sprünge an Unstetigkeitsstellen sind im Betrag kleiner als π .
2. *Itoh Bedingung:* Die Abtastung der Funktion ϕ auf dem Gitter (x_i, y_j) erfolgt so, dass der Betrag der Differenzen von benachbarten Pixeln stets kleiner als π ist [97].

Diese Definition umfasst auch Phasenverteilungen, welche nicht kontinuierlich sind, solange die Diskontinuitäten einen halben 2π -Phasensprung nicht überschreiten. Diese Bedingung ist für biologische Proben, wie Zellen in Kulturmedien, in der Regel erfüllt, da dort üblicherweise keine Brechungsindexvariationen auftreten, die einen Phasensprung dieser Größe induzieren [149, 115, 67]. In technischen Anwendungen können solche Diskontinuitäten beispielsweise durch stufenförmige Brechungsindex- oder Höhenprofile auftreten. In solchen Fällen sind weitere Annahmen oder mehrere Messungen zu einer eindeutigen Rekonstruktion der Phasenverteilung nötig [131].

Der Übergang der entfalteten Phase auf die umgebrochene Phase wird mit einem Wrap-Operator \mathcal{W} beschrieben. Der Wrap-Operator bricht eine reelle Zahl r durch Subtraktion eines ganzzahligen Vielfachen von $\pm 2\pi$ so um, dass sie auf das Intervall $[-\pi, \pi)$ abgebildet wird:

$$\mathcal{W}(r) := r - 2\pi k, r \in \mathbb{R}, \text{ mit } k \in \mathbb{Z}, \text{ sodass } r - 2\pi k \in [-\pi, \pi). \quad (4.9)$$

Anschaulich wirkt diese Operation wie eine *modulo* 2π Operation für reelle Zahlen. Der Zusammenhang zwischen einer entfalteten Phase ϕ_u und der zugehörigen umgebrochenen Phase ϕ_w ist damit gegeben als:

$$\phi_w(x, y) := \mathcal{W}(\phi_u(x, y)) = \phi_u(x, y) - 2\pi k(x, y). \quad (4.10)$$

Eindeutigkeit des Phase
Unwrapping Problems

Phase Unwrapping ist der Begriff für das Problem, aus einer umgebrochenen Phasenverteilung ϕ_w eine entfaltete Phasenverteilung ϕ_u zu bestimmen, welche $\mathcal{W}(\phi_u) = \phi_w$ erfüllt. Falls der umgebrochenen Phase eine entfaltete Phase gemäß Definition 4.1 zugrunde liegt, dann ist die Lösung des Problems eindeutig bis auf ein konstantes Vielfaches von 2π [49]. Kann also für eine umgebrochene Phasenverteilung $\phi_w(x, y)$ eine Ganzzahlverteilung $k(x, y)$ gefunden werden, sodass die Funktion $g(x, y) = \phi_w(x, y) + k(x, y)$ eine entfaltete Phase ist, dann ist $g(x, y)$ eine Lösung des Phase Unwrapping Problems. Diese Betrachtungsweise stellt die Grundlage für die Beschreibung von Phase Unwrapping als kombinatorisches Optimierungsproblem dar.

Ableitung der
Phasenverteilung

Liegt einer umgebrochenen Phasenverteilung ϕ_w eine entfaltete Phasenverteilung ϕ_u zugrunde, dann kann aus ϕ_w die Ableitung der Phase ϕ_u berechnet werden. Seien δ_x, δ_y die diskreten Differenz-Operatoren in x - bzw. y -Richtung und $\vec{\delta} = (\delta_x, \delta_y)^T$, dann gilt für die diskretisierte Ableitung der Phase [97]:

$$\vec{\delta} \phi_u(x, y) = \mathcal{W}(\vec{\delta} \phi_w(x, y)). \quad (4.11)$$

Auf diese Weise dargestellt, ist Phase Unwrapping äquivalent zu dem Problem, die physikalische Phasenverteilung durch Integration der Ableitung zu bestimmen [163]. Auch hier ist die Lösung eindeutig bis auf eine Konstante. Da eine stetige Phase ϕ_u eine skalare Funktion ist, gilt weiterhin, dass die Integration ihrer Ableitung wegunabhängig sein muss. Damit muss für jeden geschlossenen Weg C das Integral $\oint_C d\vec{s} \cdot \vec{\nabla} \phi_u(x, y) = 0$ ergeben. Dies gilt analog für eine diskretisierte Verteilung [69, 141]. Für die gefaltete Phasenverteilung folgt daraus, dass für jeden geschlossenen Weg C die Anzahl der positiven 2π

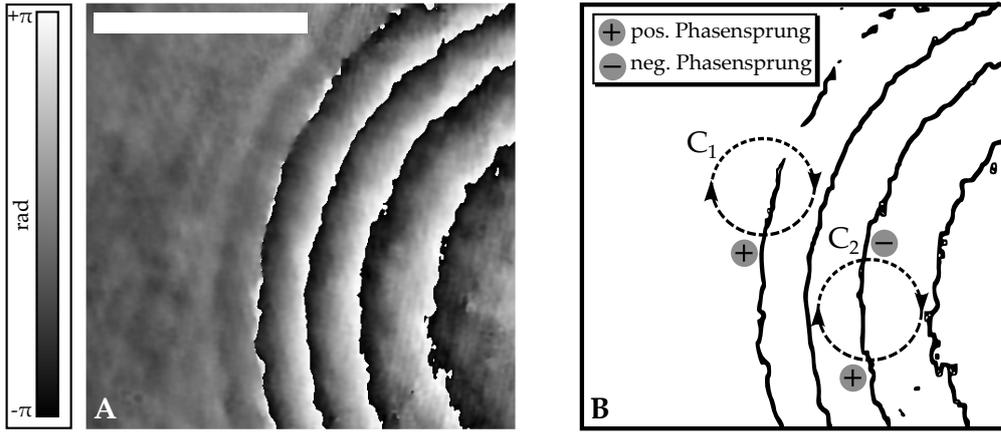


Abbildung 4.4: **A** Experimentell ermittelte, umgebrochene Phasenverteilung mit lokalen Inkonsistenzen (nach [7]). Ausschnitt aus einer digital holographischen Messung von Polystyrolkugeln in Wasser, Skalenbalken $3.5 \mu\text{m}$. **B** Schematische Darstellung der Isolinien der Phasensprünge aus Bild A. Der geschlossene Weg C_1 läuft durch eine gebrochene Isolinie und sammelt nur einen positiven Phasensprung auf. Der Endpunkt der unterbrochenen 2π -Phasensprung-Linie ist ein sogenanntes Residuum. Bei einer derart unterbrochenen Sprunglinie spricht man auch von einem *abgeflachten Phasensprung*. Hingegen umschließt Weg C_2 kein Residuum und sammelt die gleiche Anzahl von positiven und negativen Phasensprüngen auf.

Sprünge N_C^+ gleich der Anzahl der negativen 2π Sprünge N_C^- entlang dieses Weges sein muss [76]:

$$\oint_C d\vec{s} \cdot \mathcal{W}(\vec{\nabla}\phi_u) = 2\pi(N_C^+ - N_C^-) = 0. \quad (4.12)$$

Anschaulich bedeutet Gleichung 4.12, dass 2π Sprünge im Graphen einer umgebrochenen Phasenverteilung ϕ_w stets geschlossene Isolinien ergeben müssen. Ausgenommen davon sind solche Linien, die aus dem Rand des Messbereichs herauslaufen.

Aus Messdaten berechnete umgebrochene Phasenverteilungen weisen in der Regel lokale Inkonsistenzen auf, an denen die Gleichung 4.12 nicht erfüllt ist. Diese befinden sich an den Endpunkten von unterbrochenen 2π -Sprunglinien in der Phasenverteilung und werden als Residuen bezeichnet (siehe Abb. 4.4). Der Wert des Wegintegrals aus Gleichung 4.12 um das Residuum herum wird als Ladung (engl. *charge*) des Residuums bezeichnet. In der Regel, jedoch nicht immer, treten Residuen paarweise und mit entgegengesetzter Ladung auf [123]. Die in Abbildung 4.4 gezeigte charakteristische Form von Residuen als Unterbrechungen einzelner Sprunglinien entstehen in der digitalen Holographie in der Regel durch Abflachungen der Phasenverteilung beim räumlichen Filterungsprozess der Fourier-Transformations-Methode in Regionen mit Abschattungen oder niedrigem Signal-zu-Rausch Verhältnis in den interferometrischen Daten [76]. Weiterhin können Residuen entstehen durch Verletzung der Itoh Bedingung. Dies kann entweder durch unzureichende Abtastung, Speckle in den Messdaten oder durch Diskontinuitäten in der zugrun-

Residuen

deliegenden Phasenverteilung geschehen [58, 69, 198]. Für eine umgebrochene Phasenverteilung mit Residuen existiert keine eindeutige entfaltete Phase als Lösung des Phase Unwrapping Problems [100]. Residuen können das Phase Unwrapping derart beeinflussen, dass Fehler sich auf große Bereiche der Phasenverteilung fortpflanzen, die von den Residuen weit entfernt liegen [69]. Der Grad der Robustheit gegenüber Residuen ist daher eine wichtige Eigenschaft von Phase Unwrapping Algorithmen. Beim Phase Unwrapping sollen die Fehler durch Residuen auf möglichst kleine Bereiche des Ergebnisses beschränkt werden [199, 4, 123].

4.2.2 Klassen von Phase Unwrapping Algorithmen

Algorithmen zum Phase Unwrapping können in verschiedene Klassen unterteilt werden. Im Folgenden wird die Klassifikation nach Harráez *et al.* verwendet [87]. Dort werden Algorithmen kategorisiert anhand der Menge an Informationen über die Phasenverteilung, die gleichzeitig in einem Schritt verwendet wird. Es wird dabei unterschieden in globale, regionsbasierte und pfadbasierte Algorithmen.

Globale Algorithmen

Bei globalen Algorithmen wird üblicherweise eine Kostenfunktion aufgestellt, die alle Bildpunkte der umgebrochenen Phasenverteilung zugleich berücksichtigt [65]. Die Minimierung der Kostenfunktion löst das Phase Unwrapping Problem. Dies wird beispielsweise durch Integration auf der Basis von schnellen Transformationen [66, 151, 163], durch Optimierung einer bayesischen Schätzfunktion [131, 161] oder durch Netzwerkoptimierung [58, 36, 30] erreicht. Globale Methoden zeigen im Allgemeinen eine hohe Robustheit gegenüber Residuen, die jedoch in der Regel mit einem hohen Rechenaufwand einhergeht [87, 10].

Regionsbasierte Algorithmen

Regionsbasierte Algorithmen unterteilen die umgebrochene Phasenverteilung in Teilregionen. Diese Teilregionen werden unabhängig voneinander entfaltet und in einem zweiten Schritt zu einer entfalteten Phasenverteilung zusammengefügt [10]. Für die Entfaltung der Teilregionen werden oft einfache Phase Unwrapping Algorithmen eingesetzt [60, 182, 31] oder die Teilregionen werden soweit verkleinert, dass ein Phase Unwrapping der einzelnen Teile trivial wird [86, 10]. Das Zusammenfügen der Teilregionen wird in der Regel durch einen zweiten, unabhängigen Algorithmus erreicht [60, 182, 202]. Regionsbasierte Algorithmen besitzen im Vergleich zu globalen Algorithmen einen geringeren Rechenaufwand auf Kosten einer leicht verminderten Robustheit gegenüber Residuen [87].

Pfadbasierte Algorithmen

Pfadbasierte Algorithmen entfalten die umgebrochene Phasenverteilung, indem sie 2π Phasensprünge entlang eines Pfades detektieren [87]. Diese Pfade werden oft anhand von Qualitätskriterien ausgewählt [153, 87, 141]. Es ist jedoch auch möglich, die Residuen vor dem Phase Unwrapping zu identifizieren und zu isolieren, um ihren Einfluss auf das Resultat zu minimieren [69, 29, 4]. Pfadbasierte Algorithmen nutzen zu jedem Zeitpunkt nur Informationen über die umgebrochene Phase in der Nähe des Unwrapping-Pfades. Sie können daher in der Regel mit wenig Rechen- und Speicheraufwand implementiert werden [87, 149]. Für viele reale Phase Unwrapping Probleme führen diese Algorithmen zu zufriedenstellenden Ergebnissen, dennoch können Residuen

und Rauschen Fehler verursachen, die sich entlang des Pfades auf weite Bildbereiche fortpflanzen [87].

4.2.3 Kachelbasierte Phase Unwrapping Algorithmen

Kachelbasierte Algorithmen zum Phase Unwrapping gehören zur Klasse von regionsbasierten Algorithmen und unterteilen die umgebrochene Phasenverteilung ϕ_w in rechteckige Kacheln (engl. *tiles*) [178, 182, 202]. Die umgebrochene Phase liege auf einem diskreten Gitter (x_i, y_j) mit $N_x \times N_y$ Pixeln in x - bzw. y -Richtung vor. Das Pixelraster wird in $N_\tau = N_{\tau_x} \times N_{\tau_y}$ Kacheln in x - bzw. y -Richtung unterteilt. Die Aufteilung wird so durchgeführt, dass möglichst viele Kacheln die gleichen Dimensionen haben. Falls nicht alle Kacheln die gleichen Dimensionen haben können, werden kleinere Kacheln in der Spalte am rechten Bildrand und der untersten Zeile positioniert. Eine einzelne Kachel an Position (w, h) wird mit $\tau_{w,h}$ bezeichnet. Dabei entspricht die w -Koordinate der x -Richtung des Rasters und h der y -Richtung, mit $w = 1, \dots, N_{\tau_x}$, $h = 1, \dots, N_{\tau_y}$. Nach der Aufteilung in Kacheln läuft das Phase Unwrapping in einem zweistufigen Prozess ab:

1. *Phase Unwrapping einzelner Kacheln*: Die Phasenverteilung innerhalb jeder Kachel $\tau_{w,h}$ wird unabhängig von den anderen Kacheln entfaltet. Der dabei verwendete Algorithmus wird als Kachel-Unwrapper bezeichnet. *Kachel-Unwrapper*
2. *Zusammenfügen der entfalteten Kacheln (Merging)*: In diesem Schritt werden die entfalteten Kacheln durch Addition ganzzahliger Vielfacher von $\pm 2\pi$ so zusammengefügt, dass eine entfaltete Phasenverteilung entsteht. Der dabei verwendete Algorithmus wird als Kachel-Merger (kurz: Merger) bezeichnet. *Kachel-Merger*

Ein Kachel-Unwrapper besitzt nur Informationen über die Phase innerhalb einer Kachel. Innerhalb dieser Kachel produziert dieser eine lokale entfaltete Phasenverteilung, die der globalen entfalteten Phasenverteilung bis auf einen Versatz von einem Vielfachen von 2π gleicht. Dieser Versatz kann für jede Kachel anders sein, sodass Sprünge von Vielfachen von $\pm 2\pi$ zwischen den Kacheln auftreten können. Diese Sprünge werden erst im zweiten Schritt durch den Kachel-Merger verstetigt.

Ein kachelbasierter Phase Unwrapping Algorithmus besteht stets aus einer Kombination von Kachel-Unwrapper und Merger Algorithmen. Der wesentliche Vorteil kachelbasierter Algorithmen ist, dass die Entfaltung der Teilregionen durch den Kachel-Unwrapper unabhängig voneinander erfolgen kann. Dieser Schritt kann daher durch Parallelisierung sehr effizient implementiert werden. Schematisch ist der Prozess des kachelbasierten Phase Unwrappings in Abbildung 4.5 dargestellt.

4.2.3.1 Kanten und Kantendifferenzen

Nach dem Kachel-Unwrapping schließen benachbarte Kacheln in der Regel nicht stetig aneinander an, sondern zeigen Phasensprünge an Grenzen zwischen zwei Kacheln. Solche Grenzen werden in dieser Arbeit als Kanten (engl.

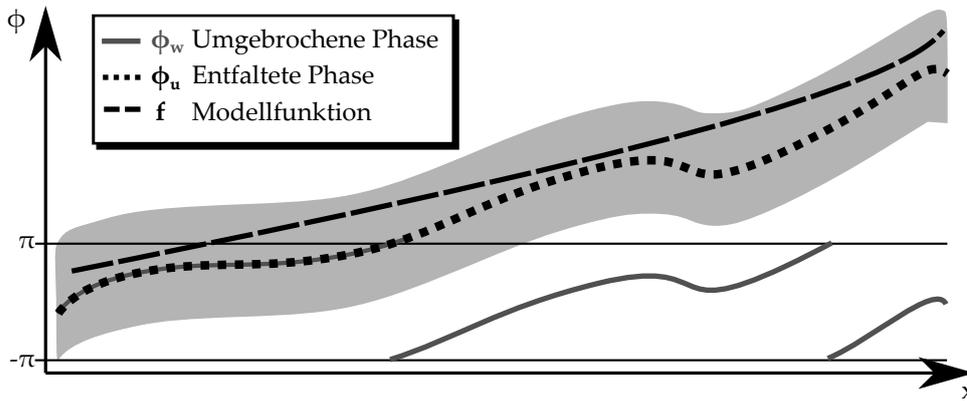


Abbildung 4.6: Prinzip des modellbasierten Phase Unwrapping nach Lemma 4.1. Aus einer gegebenen umgebrochenen Phase kann die zugehörige entfaltete Phasenverteilung berechnet werden. Dies ist möglich, wenn eine Modellfunktion für die entfaltete Phase bestimmt werden kann, die um nicht mehr als $\pm\pi$ von der wahren entfalteten Phase abweicht. Der Bereich entsprechend $\pm\pi$ um die entfaltete Phase ist grau schattiert.

Dieses Lemma folgt aus Gleichungen 4.9 und 4.10. Damit ist es möglich, die unbekannte entfaltete Phasenverteilung ϕ_u einer Kachel aus der umgebrochenen Phasenverteilung ϕ_w zu rekonstruieren, falls eine hinreichend gute Schätzung f für die entfaltete Phase vorliegt. Eine hinreichend gute Schätzung im Sinne des Lemmas liegt dann vor, wenn die Funktion f von der wahren entfalteten Phase ϕ_u um nicht mehr als π abweicht. Die Modellfunktion ist allerdings nicht notwendigerweise als möglichst genaue Näherung für die entfaltete Phase zu verstehen. Sie darf im Rahmen der zulässigen Abweichung einen Verlauf zeigen, der sich deutlich von der wahren entfalteten Phase unterscheidet (siehe Abb. 4.6).

Beim modellbasierten Phase Unwrapping ist f eine Modellfunktion, die anhand eines Satzes von Parametern an die entfaltete Phase ϕ_u angepasst wird. Diese Anpassung kann anhand der nach Gleichung 4.11 bekannten Ableitung der entfalteten Phase durchgeführt werden [121, 201]. Dieser Ansatz wird auch in der vorliegenden Arbeit angewandt.

4.2.5 Spezielle Phase Unwrapping Algorithmen : SRNCP und BLS

In diesem Abschnitt werden zwei Phase Unwrapping Algorithmen vorgestellt, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind. Einige grundlegende Konzepte dieser Algorithmen fanden Verwendung in den Phase Unwrapping Algorithmen, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden. Die Notation zur Beschreibung beider Algorithmen wurde so angepasst, dass sie mit der Schreibweise der vorliegenden Arbeit konsistent ist.

4.2.5.1 Sorting by reliability following a noncontinuous path (SRNCP)

Der SRNCP-Phase Unwrapping Algorithmus wurde in [87] von Harráez *et al.* beschrieben und ist ein Hybrid aus einem pfadbasierten und einem regionsbasierten Algorithmus. Die Pixel des Bildes werden dabei mit einem Qualitäts-

Algorithmus 4.1 : Pixelbasierter SRNCP-Algorithmus nach Harráez *et. al*

Input : Umgebrosene Phasenverteilung ϕ_w auf Pixelraster (x, y)
 Liste \mathcal{L}_g der Kanten \mathcal{J} mit zugehöriger Verlässlichkeit

Output : Entfaltete Phasenverteilung

```

1 Sortiere Liste der Kanten  $\mathcal{L}_g$  nach absteigender Verlässlichkeit
2 for  $i \leftarrow 1$  to Anzahl Elemente  $\mathcal{L}_g$  do
3    $\mathcal{J}_{AB} \leftarrow \mathcal{L}_g[i]$  // A,B: Pixel der Kante
4   if kein Pixel von A,B gehört zu einer Gruppe then
5     Entfalte Pixel A bezüglich Pixel B
6     Füge beide Pixel einer neuen Gruppe hinzu
7   else if genau ein Pixel von A,B gehört zu einer Gruppe then
8     Entfalte den Pixel ohne Gruppe bezüglich der Gruppe
9     Füge den entsprechenden Pixel zur Gruppe hinzu
10  else
11    Entfalte die kleinere Gruppe bezüglich der größeren Gruppe
12    Vereinige beide Gruppen

```

maß versehen, anhand dessen ein Unwrapping Pfad vorgegeben wird, der die Pixel zu immer größeren Regionen zusammenfügt. Der Pfad wird jedoch nicht kontinuierlich abgearbeitet, sodass in den frühen Iterationen des Algorithmus getrennte Regionen mit entfalteten Phasenverteilungen entstehen.

Für alle Pixel des Rasters (x, y) wird eine Verlässlichkeit (engl. *reliability*) $R(x, y)$ berechnet. Die Verlässlichkeit für jeden Pixel ist dabei definiert als das Inverse der zweiten Ableitung am Ort des Pixels bezüglich seiner horizontalen, vertikalen und diagonalen Nachbarn. Die exakte Definition von $R(x, y)$ findet sich in [87]. Pixel in rauscharmen Bereichen bekommen so eine größere Verlässlichkeit zugewiesen als Pixel in Bereichen mit erhöhten Rauschanteilen. Für den Unwrapping Prozess wird jedoch nicht die Verlässlichkeit von Pixeln genutzt, sondern die Verlässlichkeit $R(\mathcal{J})$ von Kanten zwischen zwei Nachbarpixeln (engl. *junctions*). Die Kanten sind zwischen horizontalen und vertikalen Nachbarpixeln definiert. Eine Kante zwischen zwei Nachbarpixeln an Positionen $A(x_A, y_A)$ und $B(x_B, y_B)$ wird mit \mathcal{J}_{AB} bezeichnet. Ihre Verlässlichkeit ist die Summe der Verlässlichkeiten der zugehörigen Nachbarpixel $R(\mathcal{J}_{AB}) = R(A) + R(B)$.

Nach der Berechnung der Verlässlichkeit beginnt das iterative Entfalten der Kanten. Dabei werden Kanten nach absteigender Verlässlichkeit entfaltet. Die derart entfalteten Bildpunkte werden im Laufe der Iterationen zu Gruppen zusammengefasst und bezüglich einander entfaltet, siehe Algorithmus 4.1. Das Entfalten eines Pixels A bezüglich eines Nachbarpixels B bedeutet, dass auf den Wert von Pixel A ein Vielfaches von $\pm 2\pi$ addiert wird, sodass die Differenz zum Nachbarpixel minimal ist, formal:

$$\text{Val}(A) \rightarrow \text{Val}(A) + 2\pi \cdot \text{runden} \left(\frac{\text{Val}(B) - \text{Val}(A)}{2\pi} \right).$$

Dabei bezeichnet $\text{Val}(\cdot)$ den Wert eines Pixels. Die Entfaltung einer Gruppe von Pixeln bezüglich einer anderen Gruppe ist analog definiert, dabei wird

der Phasensprung auf eine ganze Gruppe addiert. Dadurch, dass zuerst die Entfaltung der Kanten mit hoher Verlässlichkeit erfolgt, wird der Einfluss von Residuen in der Regel auf kleine Bildbereiche beschränkt. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Algorithmus als *pixelbasierter SRNCP* Unwrapper bezeichnet, um Verwechslungen mit der in Kapitel 6.1.2 entwickelten, kachelbasierten Adaption zu vermeiden.

4.2.5.2 Block Least Squares (BLS)

Der Block Least Squares Algorithmus wurde von Strand *et. al* in [182] vorgestellt und gehört zur Klasse der kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen. Der entsprechende Kachel-Unwrapper wird in dieser Arbeit als BLS Kachel-Unwrapper bezeichnet. Weiterhin werden von Strand *et al.* zwei Kachel-Merger beschrieben, von denen einer mit einer Pixelmaske arbeitet, die zusätzlich zu der umgebrochenen Phasenverteilung übergeben wird. Die in dieser Arbeit behandelten und entwickelten Phase Unwrapping Algorithmen arbeiten jedoch nur mit der umgebrochenen Phasenverteilung ohne weitere Zusatzinformationen. Darum wird hier derjenige Merger Algorithmus ausgewählt, welcher ohne Pixelmaske arbeitet und im Folgenden als BLS-Merger bezeichnet.

Der BLS-Unwrapper nutzt zum Phase Unwrapping einzelner Kacheln einen Spezialfall von Lemma 4.1 mit einer konstanten Modellfunktion $f(x, y) = \rho$. Die Konstante ρ wird variiert und die Phasenverteilung

BLS Kachel-Unwrapper

$$\phi_\rho(x, y) := \rho + \mathcal{W}(\phi_w(x, y) - \rho)$$

aus der umgebrochenen Phase ϕ_w auf der Kachel berechnet. Weiterhin wird eine Straffunktion $S(\rho)$ definiert, deren Wert ein Maß für die Anzahl und Höhe von 2π -Phasensprüngen der Phasenverteilung ϕ_ρ ist:

$$S(\rho) := \langle \|\delta_x \phi_\rho(x, y)\|_2 \rangle + \langle \|\delta_y \phi_\rho(x, y)\|_2 \rangle.$$

Hier sind δ_x, δ_y die diskreten Ableitungsoperatoren wie in Gleichung 4.11 und $\langle \cdot \rangle$ bezeichnet den arithmetischen Mittelwert einer Funktion für alle Positionen (x, y) . Zu beachten ist, dass im Gegensatz zu Gleichung 4.11 die diskrete Ableitung nicht von einer Wrap-Operation gefolgt wird. Damit wird an Phasensprüngen nicht umgebrochen, sondern diese gehen besonders stark in den Wert der Straffunktion ein. Ist also $\phi_{\rho'}$ eine entfaltete Phasenverteilung, dann ist der Wert von $S(\rho')$ kleiner als für alle Verteilungen ϕ_ρ , die Phasensprünge enthalten. Beim BLS Kachel-Unwrapper wird ein Minimum der Straffunktion $S(\rho)$ gesucht und die zugehörige Phasenverteilung ϕ_ρ als Lösung für die entfaltete Phase verwendet. Die Minimierung erfolgt dabei so, dass das Intervall $[-\pi, \pi)$ in N_ρ äquidistante Schritte unterteilt wird und die Straffunktion für jeden dieser Werte berechnet wird. Die Funktionsweise des BLS-Unwrappers ist in Algorithmus 4.2 beschrieben. Eine notwendige Voraussetzung für die erfolgreiche Entfaltung einer Kachel mit dem BLS Kachel-Unwrapper ist, dass die entfaltete Phasenverteilung innerhalb dieser Kachel nur maximal einen Wertebereich der Breite 2π enthalten darf. Dies bedeutet, dass die umgebrochene Phasenverteilung innerhalb dieser Kachel nur höchstens einen Phasensprung besitzt. Diese Eigenschaft folgt aus Lemma 4.1.

Notwendige Voraussetzung
des
BLS Algorithmus

Algorithmus 4.2 : BLS Kachel-Unwrapper nach Strand *et al.*

Input : Umgebrochene Phasenverteilung $\phi_w(x, y)$ in Kachel τ .
Anzahl von Iterationen N_ρ zur Bestimmung der entfalteten Phase.
Output : Entfaltete Phasenverteilung auf der Kachel τ

```

1 for  $\rho \leftarrow (-\pi)$  to  $+\pi$  in  $N_\rho$  Schritten do
2    $\phi_\rho(x, y) \leftarrow \rho + \mathcal{W}(\phi_w(x, y) - \rho)$ .
    $S(\rho) \leftarrow \langle \|\delta_x \phi_w(x, y)\|_2 \rangle + \langle \|\delta_y \phi_w(x, y)\|_2 \rangle$ .
3 Bestimme kleinsten Wert von  $S(\rho)$  und speichere zugehöriges  $\rho$  als  $\rho'$ .
   Setze Phasenverteilung der Kachel zu  $\phi_{\rho'}$ .

```

BLS Kachel-Merger

Der BLS Merger entfaltet Kacheln entlang eines festen Pfades, der in der linken oberen Ecke des Kachelmusters beginnt und es spaltenweise von oben nach unten durchläuft. Die Kacheln werden dabei so entfaltet, dass die Differenzen der Kanten bezüglich ihrer linken und oberen Nachbarn minimiert werden. Dazu wird ein entsprechendes ganzzahliges Vielfaches von $\pm 2\pi$ auf alle Pixel der aktuellen Kachel addiert. Der Ablauf des BLS-Mergers ist in Algorithmus 4.3 beschrieben.

Algorithmus 4.3 : BLS Kachel-Unwrapper nach Strand *et al.*

Input : Gekachelte Phasenverteilung $\{\tau_{w,h}\}$ aus je entfalteteten Kacheln
Output : Entfaltete Phasenverteilung

```

1 for  $w \leftarrow 1$  to  $N_{\tau_w}$  do
2   for  $h \leftarrow 1$  to  $N_{\tau_h}$  do
3      $\text{aktuelle\_kachel} \leftarrow \tau_{w,h}$ 
4      $\text{linker\_nachbar} \leftarrow \tau_{w-1,h}$  oder null falls nicht vorhanden
5      $\text{oberer\_nachbar} \leftarrow \tau_{w,h-1}$  oder null falls nicht vorhanden
6      $\mathcal{D}_{nb} \leftarrow \emptyset$ 
7     if  $\text{linker\_nachbar} \neq \text{null}$  then
8       // Kantendifferenz siehe Gleichung 4.13
        $\mathcal{D}_{nb} \leftarrow \mathcal{D}_{nb} \cup \mathcal{D}(\mathcal{J}(\text{aktuelle\_kachel}, \text{linker\_nachbar}))$ 
9     if  $\text{oberer\_nachbar} \neq \text{null}$  then
10       $\mathcal{D}_{nb} \leftarrow \mathcal{D}_{nb} \cup \mathcal{D}(\mathcal{J}(\text{aktuelle\_kachel}, \text{oberer\_nachbar}))$ 
11      //  $\mathcal{D}_{nb}$  enthält jetzt Kantendiff. zu Kacheln oben & links
       if  $\mathcal{D}_{nb} \neq \emptyset$  // Immer erfüllt, außer für  $(w,h)=(1,1)$ .
12       then
13          $\text{mittel} \leftarrow$  Mittelwert von  $\mathcal{D}_{nb}$ 
14          $k \leftarrow \text{runden}(\text{mittel}/(2\pi))$ 
15         Addiere  $2\pi k$  auf  $\text{aktuelle\_kachel}$ 

```

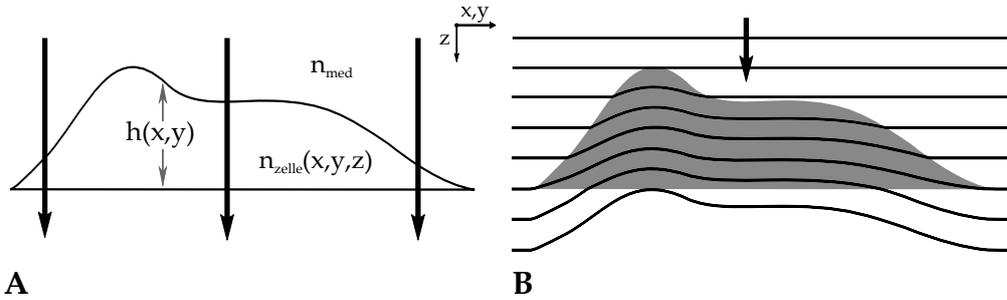


Abbildung 4.7: Propagation einer ebenen Welle durch eine Zelle. **A** Eine Lichtwelle propagiert entlang der z -Richtung durch eine Zelle mit räumlicher Brechungsindexverteilung $n_{\text{zelle}}(x, y, z)$ und Höhe $h(x, y)$. Die Wellenfront wird aufgrund des Unterschiedes zum Brechungsindex n_{Med} des umgebenden Mediums verformt. **B** Näherung des Brechungsindex einer Zelle als Konstante. Die von der Lichtwelle aufgesammelte Phase ist dann an jedem Punkt proportional zur Höhe der Zelle.

4.3 INFORMATIONSGEHALT DER DIGITALEN HOLOGRAPHIE IN DER ZELLBIOLOGIE

Wie in der Einleitung zu dieser Arbeit erwähnt, ist die digitale Holographie in der Zellbiologie besonders als Technik zur quantitativen Phasenbildgebung von Interesse. Im Folgenden wird die Beziehung der Messwerte aus der digitalen Holographie zu den biophysikalischen Eigenschaften und der Morphologie der Zelle dargestellt. Dies ist von Bedeutung, da die Interpretation nicht intuitiv ist.

Eine ebene Welle, welche entlang der z -Richtung durch eine Zelle propagiert, besitzt nach dem Durchgang durch die Zelle eine Phasenverteilung, welche mit folgendem Ausdruck beschrieben wird [55]:

$$\phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^{h(x, y)} dz (n_{\text{zelle}}(x, y, z) - n_{\text{med}}). \quad (4.15)$$

Dabei ist $h(x, y)$ die Höhe der Zelle, $n_{\text{zelle}}(x, y, z)$ ihre Brechungsindexverteilung, n_{med} der Brechungsindex des Mediums (siehe Abb. 4.7 A) und λ die Beleuchtungswellenlänge im Vakuum. Diese Verteilung wird bis auf eine additive Konstante mit der digitalen Holographie gemessen. Falls die Beleuchtungswelle eine endliche Krümmung besitzt, dann wird diese durch numerische Anpassung entfernt und es ergibt sich eine Phasenverteilung gemäß der obigen Gleichung [54]. In geeigneten Spezialfällen, z.B. bei Erythrozyten, kann der Brechungsindex einer Zelle als konstant angenommen werden, sodass sich Gleichung 4.15 zu $\phi(x, y) = 2\pi/\lambda \cdot (n_{\text{zelle}} - n_{\text{Med}})$ vereinfacht [114]. Dann ist die gemessene Phasenverteilung proportional zu der Höhe der Zelle (siehe Abb. 4.7 B).

Im Allgemeinen ist eine konstante Näherung für den Brechungsindex einer Zelle eine unzulässige Vereinfachung. Der räumliche Brechungsindex der Zelle ist abhängig von der räumlichen Verteilung der nicht-wässrigen Bestandteile im Zytoplasma, wie z.B. von Proteinen oder Nukleinsäuren. Es gilt:

$$n_{\text{zelle}}(x, y, z) = n_{\text{wasser}} + \alpha C(x, y, z). \quad (4.16)$$

Hier ist $C(x, y, z)$ die Gesamtkonzentration aller nicht-wässrigen Stoffe innerhalb der Zelle und der Proportionalitätsfaktor α das sogenannte spezifische refraktive Inkrement [41, 55]. Unter den oben genannten Voraussetzungen ergibt sich für das Phasenvolumen:

$$V_{\text{ph}} := \iint_{\text{Zelle}} dx dy \phi(x, y) \quad (4.17)$$

$$= (\alpha \cdot M_{\text{trocken}} - \underbrace{(n_{\text{med}} - n_{\text{wasser}})}_{>0} \cdot V_{\text{zelle}}) \cdot 2\pi/\lambda, \quad (4.18)$$

wobei $M_{\text{trocken}} = \iiint dx dy dz C(x, y, z)$ die Trockenmasse der Zelle ist und V_{zelle} das Zellvolumen darstellt. Die Interpretation des Phasenvolumens ist nicht trivial, da sowohl die Trockenmasse der Zelle als auch das Zellvolumen zum Phasenvolumen beitragen. Für den Fall, dass der Brechungsindex des umgebenden Mediums vernachlässigbar von dem Brechungsindex von Wasser abweicht, ist das Phasenvolumen proportional zur Trockenmasse der Zelle.

*Dynamik des
Phasenvolumens in
Spezialfällen*

Zum besseren Verständnis wird im Folgenden das Verhalten des Phasenvolumens in einigen Spezialfällen behandelt. Falls die Trockenmasse bei einem dynamischen Prozess konstant bleibt, dann wird eine Änderung des Phasenvolumens nur durch eine Änderung des Zellvolumens verursacht. Dabei ist zu beachten, dass das Zellvolumen negativ in das Phasenvolumen eingeht. Das bedeutet, dass eine Erhöhung des Zellvolumens ohne Änderung der Trockenmasse zu einer Verringerung des Phasenvolumens führt. Dies wird beispielsweise durch einen Einstrom von Wasser aus dem Medium aufgrund von osmotischen Prozessen bewirkt. Aufgrund dieses kontraintuitiven Verhaltens schlugen Rappaz *et al.* eine Methode zur Entkopplung der Messung der Trockenmasse und des Zellvolumens vor [157]. Dazu werden jedoch zwei Aufnahmen einer Zelle in unterschiedlichen Medien benötigt, sodass die Methode für die Echtzeit-Bildgebung ungeeignet ist.

Ein weiterer Spezialfall ist der Einstrom von Medium in die Zelle. In diesem Fall ändert sich das Phasenvolumen nicht, da durch die Beimischung von Medium zum Zellplasma kein weiterer Gangunterschied zum umgebenden Medium verursacht wird, vgl. Gleichung 4.15. Als letzter Spezialfall wird der Ausstrom von Zellplasma und ein damit einhergehender Verlust von Trockenmasse und Zellvolumen betrachtet. In diesem Fall verringert sich das Phasenvolumen, da die optische Weglänge beim Durchlaufen der Zelle kürzer wird.

KOMBINATION VON DIGITALER HOLOGRAPHIE UND FLUORESCENZBILDGEBUNG ZUR UNTERSUCHUNG DER GNP-VERMITTELTEN LASERPERFORATION VON ZELLEN

GEGENSTAND dieses Kapitels ist ein im Rahmen dieser Arbeit entwickelter experimenteller Aufbau zur multimodalen Bildgebung und Laserperforation von Zellen. Der Aufbau wird in Abschnitt 5.1 vorgestellt und kombiniert digitale Holographie und Fluoreszenzbildgebung. In Abschnitt 5.2 wird damit das Verhalten von Zellen auf die Goldnanopartikel (GNP)-vermittelte Laserperforation anhand von morphologischen und biophysikalischen Parametern untersucht. Die Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Parameter werden in Abschnitt 5.3 analysiert und danach abschließend zusammengefasst.

5.1 MULTIMODALER PERFORATIONS- UND BILDGEBUNGSAUFBAU

Es wurde ein Aufbau realisiert, welcher die Untersuchung von GNP-vermittelter Laserperforation von Zellen *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Holographie ermöglicht (siehe Abb. 5.1). Dazu wurde ein konventionelles inverses Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver.A1) mit einer Inkubationskammer (H101) ausgestattet, die auf einen motorisierten xy-Verschietisch (ProScan II) montiert wurde. In der Inkubationskammer wurden Zellen bei einer Temperatur von 37 °C mit einem CO₂ Gehalt von 5% inkubiert. Für die Bildgebungs- und Perforationsprozesse wurde der Deckel der Kammer geöffnet, die Heizung und Begasung waren aktiv. Es wurden adhärenente Zellen auf dem Boden von Kulturschalen aus Glas untersucht. Zur Bildgebung wurde ein 63× Objektiv (Plan-Apochromat) mit einer numerischen Apertur NA = 1,40 verwendet.

Die Weißlichtbeleuchtung des Mikroskops wurde entfernt und durch einen eigenen Beleuchtungs- und Perforationsstrahlengang ersetzt. Eine Hellfeldbeleuchtung wurde mittels einer Leuchtdiode (LMXL-PL01-0050) realisiert. Für die digitale Holographie diente ein Helium-Neon (HeNe) Laser (05-LHP-111) als kohärente Lichtquelle. Dieser wurde über ein Zweilinsensystem von oben so schwach in die Ebene der adhärenenten Zellen fokussiert, dass das ganze Sichtfeld des Objektivs ausgeleuchtet war. Für die Zellperforation wurde der Strahl eines gepulsten Nd:YAG Mikrochiplasers (Horus) mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels parallel zur kohärenenten Beleuchtung eingekoppelt. Die Zentralwellenlänge des Perforationslasers ist 532 nm mit einer Pulsdauer von 850 ps und Repetitionsrate von 20,25 kHz. Dieser Laser wurde ebenfalls in die Ebene der Zellen fokussiert, wobei ein Strahldurchmesser von ca. 80 µm erreicht wurde. Die Bestrahlungszeit des Perforationslasers wurde durch einen mechanischen Shutter (SH05) kontrolliert. Die Regelung der Leistung erfolgte mit einer Abschwächereinheit, bestehend aus polarisierendem Strahlteiler

AxioObserver.A1
Carl Zeiss, Deutschland

H101
oko-lab, Italien

ProScan II
Prior Scientific, UK

Plan-Apochromat
63× / 1.40 Oil M27,
Carl Zeiss, Deutschland

LMXL-PL01-0050
Luxeon Rebel Amber
Philips Lumileds, USA

05-LHP-111
Melles Griot, USA

Horus
Frankreich

SH05
Optical Beam Shutter,
Thorlabs, USA

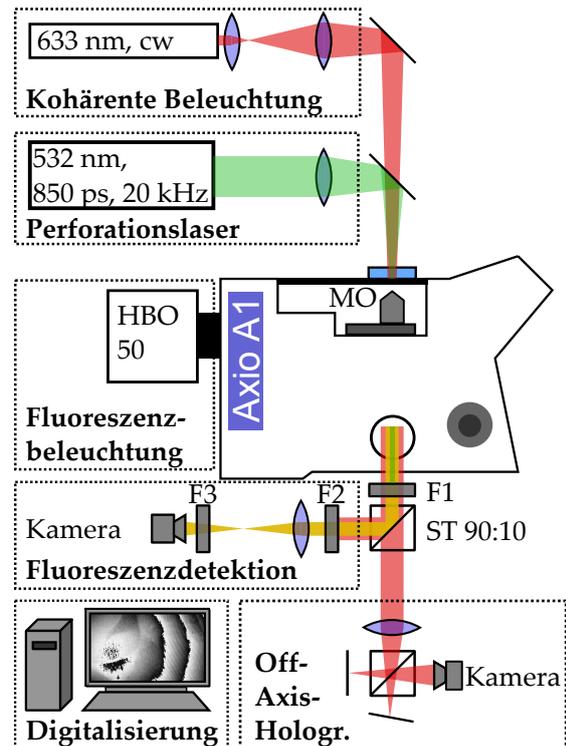


Abbildung 5.1: Schema des Messaufbaus zur multimodalen Bildgebung und Zellperforation (nach [103]). Ein kommerzielles Fluoreszenzmikroskop wurde um Einheiten zur digital holographischen Bildgebung und zur Zellperforation erweitert. Von oben wird ein Helium-Neon (HeNe) Laser in das Mikroskop eingekoppelt und mit einem Pikosekundenlaser überlagert. Der HeNe Laser dient als kohärente Beleuchtungsquelle. Eine Quecksilberdampfampe wird zur Fluoreszenzanregung eingesetzt. Ein gepulster Nd:YAG Pikosekundenlaser wird zur Zellperforation verwendet und am seitlichen Ausgang des Mikroskops durch einen Bandsperrfilter geblockt. Das restliche Licht wird mit einem Strahlteiler zwischen der Fluoreszenzeinheit und der digitalen Holographie aufgeteilt. **Abkürzungen:** MO: Mikroskopobjektiv, HBO: Quecksilberdampfampe, F1: Bandsperrfilter 532 nm, F2: Bandsperrfilter 633 nm, F3: Fluoreszenzfilter, ST: Strahlteiler.

und Halbwellenplatte. Als Beleuchtungsquelle für die Fluoreszenzbildgebung wurde eine Quecksilberdampfampe (HBO 50) verwendet.

An dem seitlichen Ausgang des Mikroskops wird der Perforationsstrahl mit einem Bandsperrfilter blockiert (NF533-17). Im Anschluss wird das durch die Probe transmittierte Licht sowie das Fluoreszenzlicht durch einen 90:10 Strahlteiler (BS028) zwischen den Bildgebungseinheiten zur Fluoreszenz und digitalen Holographie aufgeteilt. Der Großteil des Lichtes wird in die Fluoreszenzeinheit reflektiert, wo die kohärente Beleuchtung durch einen Bandsperrfilter (NF633-25) geblockt wird. Daraufhin passiert das Licht eine Filtereinheit mit austauschbaren Fluoreszenzfiltern und wird auf eine Fluoreszenzkamera (ProgRes MF cool) abgebildet und damit aufgenommen. Der Rest des Lichtes wird in eine Einheit zur digital holographischen Bildgebung transmittiert, die nach dem Ansatz von Kemper *et al.* aufgebaut ist [115]. Dies ist ein off-axis

HBO 50

Carl Zeiss, Deutschland

NF533-17

Notch Filter OD6,

Thorlabs

BS028

Non-Polarizing Beam
Splitter Cube, Thorlabs

NF633-25

Notch Filter OD6,

Thorlabs

ProgRes MF cool

JENOPTIK, Deutschland

interferometrischer Aufbau für die digitale Holographie, in dem die Phasenverteilung einer Objektwelle mit einer verkippten Kopie superponiert (vgl. Abschnitt 4.1.1). Die Verkipfung wurde dabei so eingestellt, dass die untersuchte Zelle mit einem freien Bildbereich überlagert wurde. Das resultierende Interferogramm wurde mit einer CMOS Kamera (SME-B050-U) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden an einem Rechner digitalisiert und gespeichert. Die Steuerung der mechanischen und elektrischen Komponenten des Aufbaus erfolgte mit μ Manager und ImageJ [1, 48].

SME-B050-U
USB3.0 Monochrome Camera,
Mightex Systems, Canada

5.2 DIGITALE HOLOGRAPHIE UND FLUORESCENZBILDGEBUNG NACH DER LASERPERFORATION

Der experimentelle Aufbau ermöglicht die Untersuchung der morphologischen und biophysikalischen Eigenschaften der Zellen nach der GNP-vermittelten Laserperforation. Sämtliche Experimente zur GNP-vermittelten Laserperforation wurden an caninen ZMTH₃ Zellen ausgeführt, zur Verfügung gestellt von Escobar *et al.* [52]. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (SLM-140-B) Medium, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (S 0615) und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (516106) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Unmittelbar vor der Laserbestrahlung wurde das Medium durch RPMI 1640 ohne den pH-Indikator Phenolrot (F1257) ersetzt, um eine Absorption des Perforationslasers zu verhindern. Sämtliche Messungen wurden an adhären Zellen in 35 mm Zellkulturschalen mit Glasboden (81158) durchgeführt. Für die Fluoreszenzbildgebung wurden 10⁵ Zellen pro Kulturschale einen Tag vor den Experimenten ausgesät. Für die digital holographische Bildgebung wurden 10⁴ Zellen ausgesät, um ausreichend freie Bereiche in der Kulturschale zu erzielen. Drei Stunden vor der Laserbestrahlung wurde das Zellmedium mit sphärischen Goldnanopartikeln (PGO-200) mit einem Durchmesser von 200 nm versetzt. Unmittelbar vor der Laserbestrahlung wurde das Zellmedium durch neues Medium ohne Phenolrot ersetzt und dadurch die nicht sedimentierten Goldnanopartikel abgewaschen. Für sämtliche Experimente zur Laserperforation wurde ein Parameterfeld aus drei Fluenzen Φ im Fokus des Perforationslasers mit $\Phi = 15 \text{ mJ/cm}^2$, 27 mJ/cm^2 und 41 mJ/cm^2 sowie zwei Bestrahlungsdauern $t_{\text{irr}} = 10 \text{ ms}$ und 20 ms festgesetzt. Zusätzlich wurden Kontrollgruppen ohne Laserbestrahlung untersucht. Das Parameterfeld besitzt vergleichbare Fluenzen, wie das etablierte Verfahren der GNP-vermittelten (GNOME)-Lasertransfektion, wenngleich die effektiven Bestrahlungsdauern bei der GNOME-Lasertransfektion aufgrund des rasternden Prinzips kürzer sind. Die Konzentration der Goldnanopartikel wurde auf $0.5 \mu\text{g/cm}^2$ festgesetzt und entspricht dem Parameter bei der GNOME Laserperforation [85, 103].

SLM-140-B
RPMI 1640 Medium (1X),
Merck, Deutschland

S 0615
FBS Superior, Biochrom
AG, Deutschland

516106
Penicillin /
Streptomycin, 100X,
Tissue Culture Grade -
Calbiochem, Merck

F1257
RPMI 1640 w/o Phenol Red,
Merck Deutschland

81158
 μ Dish, ibidi,
Deutschland

PGO-200
Kisker Biotech,
Deutschland

Parameterfeld der
Laserperforation: Fluenz,
Bestrahlungsdauer,
Partikelkonzentration

5.2.1 Vitalität und Perforationseffizienz

Eines der primären Ziele der GNP-vermittelten Laserperforation ist die Zelltransfektion, also das Einbringen von externen Molekülen durch Permeabilisierung der Zellmembran in eine große Anzahl von Zellen [84, 106]. Daher gehören die Vitalität der Zellen nach der Laserperforation sowie die Perforations-

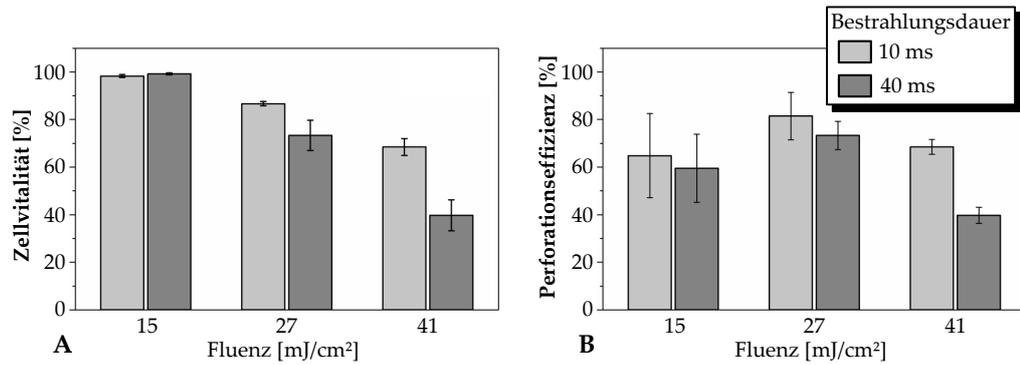


Abbildung 5.2: Die **A** Zellvitalität und **B** Perforationseffizienz in Abhängigkeit von der Fluenz des Perforationsstrahls und der Bestrahlungsdauer (nach [103]). Die Zellvitalität ist normiert auf das Ergebnis einer nicht bestrahlten Kontrollgruppe. Die Perforationseffizienz ist das Produkt aus der Zellvitalität und dem Anteil der perforierten Zellen. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsreihen. Jede Versuchsreihe umfasste 30 bestrahlte Zellen in 3 unabhängigen Kulturschalen.

effizienz zu den am häufigsten untersuchten Parametern [85, 104]. Die Vitalität und die Perforationseffizienz wurden in zwei verschiedenen Experimenten an jeweils 30 bestrahlten Zellen in drei unabhängigen Zellkulturschalen bestimmt. Für die Bestimmung der Vitalität wurde ein Lebend-Tot Assay mit den Farbstoffen Calcein AM (1 μ M, C3099) und Propidiumiodid (1.5 μ M, P1304MP) eine Stunde nach der Laserperforation angewendet. Calcein AM kann die Zellmembran passieren und wird durch metabolische Prozesse in lebenden Zellen zu dem fluoreszenten Farbstoff Calcein umgewandelt. Dieses wurde mit einem 480 nm \pm 18 nm Bandpassfilter angeregt und mit einem 520 nm Langpassfilter detektiert. Der Farbstoff Propidiumiodid wird fluoreszent durch eine Bindung an die DNA, kann aber bei vitalen Zellen die intakte Membran nicht passieren. Die Propidiumiodid-Fluoreszenz wurde mit einem 535 nm \pm 20 nm Bandpassfilter angeregt und mit einem 610 nm \pm 25 nm Filter detektiert. Zellen, die ein Signal für Calcein und kein Signal für Propidiumiodid zeigten, wurden als lebend gezählt, die restlichen Zellen als tot. Die Vitalität der Zellen wurde für alle Kombinationen aus Fluenz und Bestrahlungsdauer berechnet und auf die Vitalität der nicht bestrahlten Kontrollgruppe normiert. Die Vitalität der Zellen nach der Laserbestrahlung nimmt mit steigender Fluenz und Bestrahlungszeit ab (siehe Abb. 5.2 A).

Um die Perforationseffizienz zu bestimmen, wurde in einem zweiten Experiment kontrolliert, ob die Zellmembran in der ersten Minute nach der Bestrahlung permeabilisiert wurde. Dazu wurde das Zellmedium mit 1.5 μ M Propidiumiodid versetzt und die Fluoreszenz der bestrahlten Zellen kontrolliert. In der ersten Minute nach der Bestrahlung zeigt der Einstrom von Propidiumiodid eine Perforation der Zellmembran an. Für jeden Parametersatz wurde die relative Häufigkeit der Perforation als das Verhältnis von Zellen mit Propidiumiodid-Signal zu der Gesamtzahl der bestrahlten Zellen berechnet. Diese relative Häufigkeit wurde mit der zuvor bestimmten Vitalität multipliziert, um die Perforationseffizienz zu erhalten (siehe Abb. 5.2). Die Perforati-

C3099

Calcein AM,
ThermoFischer Scientific,
USA

P1304MP

Propidium Iodide,
ThermoFischer Scientific

onseffizienz ist also ein Maß für die Anzahl der vitalen Zellen mit einer perforierten Membran. Diese war maximal für die Fluenz von 27 mJ/cm^2 . Bei der niedrigsten verwendeten Fluenz von 15 mJ/cm^2 waren praktisch alle Zellen vital nach der Laserperforation. Die geringe Perforationseffizienz ist in diesem Fall durch eine geringe Anzahl von Membranperforationen zu erklären. Für die höchste verwendete Fluenz ist die niedrige Perforationseffizienz durch eine Verringerung der Vitalität zu erklären. Nahezu alle Zellen zeigten bei dieser Fluenz einen Einstrom von Propidiumiodid.

5.2.2 *Calciumsignal nach der Laserperforation*

Die Konzentration von intrazellulärem Calcium nach der GNP-vermittelten Laserperforation wurde mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 gemessen. Um die Zellen mit Fluo-4 zu beladen, wurde die Fluo-4 AM (F-14201) Form genutzt, die die Membran passieren kann. Diese wurde in das Medium gegeben und die Zellen wurden für 20 min bei 37°C inkubiert. Innerhalb von Zellen wird Fluo-4 AM zu dem Farbstoff Fluo-4 umgewandelt. Dieser wird nach Bindung an Ca^{2+} -Ionen fluoreszent. Durch einen anschließenden Austausch des Mediums wurde sichergestellt, dass der Farbstoff nur innerhalb der Zellen vorlag. Die Fluoreszenz wurde mit einem $475 \text{ nm} \pm 35 \text{ nm}$ Bandpassfilter angeregt und mit einem $545 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ Filter detektiert.

F-14201

*Fluo-4 AM, cell permeant,
ThermoFischer Scientific*

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit der Fluo-4 Intensität von der Bestrahlungsdauer und der Fluenz untersucht. Dazu wurde für jede Kombination von Bestrahlungsdauer und Fluenz des Parameterfeldes (vgl. Abschnitt 5.2.1) das Fluoreszenzsignal von jeweils fünf bestrahlten Zellen in drei unabhängigen Kulturschalen aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit linearer Verstärkung der Fluoreszenzkamera und 200 ms Belichtungszeit in einem Zeitraum von circa 1 s vor der Bestrahlung bis 18 s nach der Bestrahlung. In den resultierenden Graustufenbildern wurden die Zellen manuell in ImageJ umrandet und das summierte Fluoreszenzsignal $F(t)$ innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit t gemessen. Das Hintergrundsignal wurde in einem Bereich ohne Zellen bestimmt und abgezogen. Es wurde dann der Verlauf der Fluoreszenzintensität in der Form $\Delta F/F_0$ bestimmt, wie es bei der Calcium-Bildgebung üblich ist [103]:

$$\Delta F(t)/F_0 = \frac{F(t) - F_0}{F_0}.$$

Dabei ist F_0 die Fluoreszenzintensität vor der Bestrahlung. Der zeitliche Verlauf der Fluo-4 Intensität für das Parameterfeld ist in Abb. 5.4 dargestellt. In Abb. 5.3 ist eine Zeitserie für die Fluoreszenzaufnahmen beispielhaft gezeigt. Das Fluoreszenzsignal zeigte ein Maximum nach 2 – 4 s nach Laserbestrahlung der Zellen, gefolgt von einem annähernd linearem Abfall. Ein Abfall der Fluoreszenzintensität wurde verursacht durch einen Abfall der Konzentration von Ca^{2+} -Ionen sowie durch ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs. Für eine Bestrahlungsdauer von 40 ms war das Spitzensignal stets höher als bei gleicher Fluenz des Perforationslasers bei kürzerer Bestrahlung. Für gleiche Bestrahlungsdauern war das Spitzensignal des Farbstoffs maximal für die Flu-

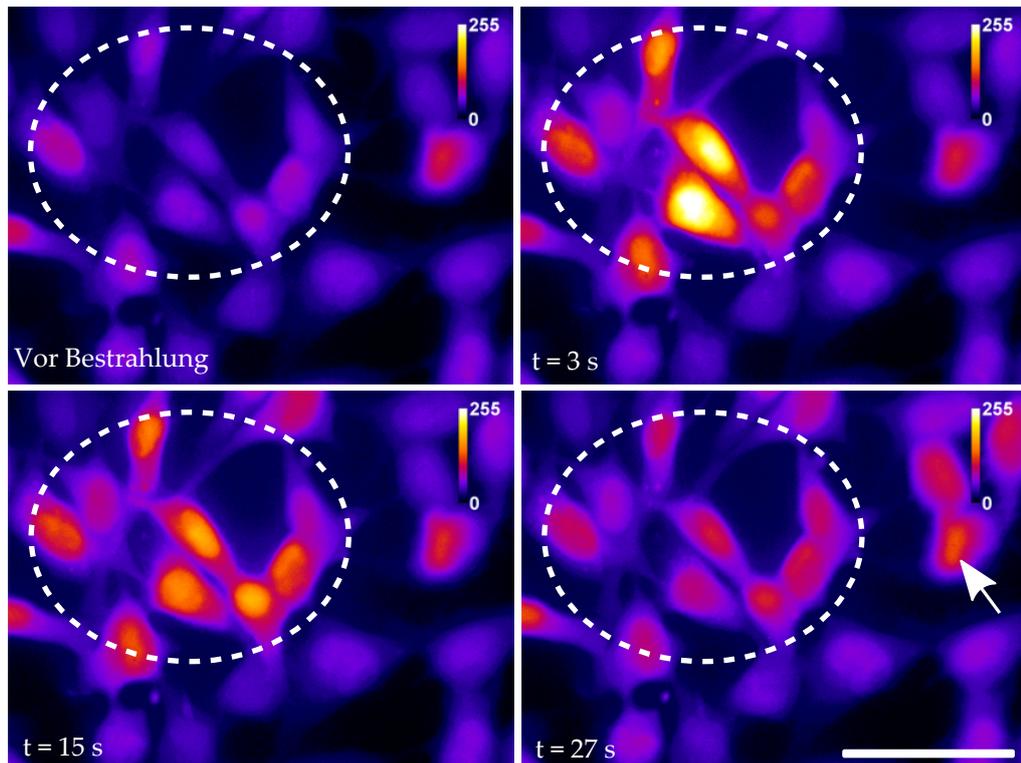


Abbildung 5.3: Calciumsignal der Zellen nach der GNP-vermittelten Laserperforation. Gezeigt ist die Intensität des Calciumindikators Fluo-4 zu verschiedenen Zeitpunkten t nach der Bestrahlung. Die Bestrahlungsdauer ist 40 ms, die Fluenz 27 mJ/cm^2 im Kulturmedium RPMI. Die gestrichelte Linie zeigt die vom Perforationslaser bestrahlte Fläche. Das Fluo-4 Signal steigt bis ca. 3 s nach der Bestrahlung auf ein Maximum an und nimmt danach langsam ab (vergleiche auch Abb. 5.4). Im letzten Bild ist die Propagation einer extrazellulären Calciumwelle markiert, die sich auch über nicht bestrahlte Zellen weiter ausbreitet. Die Helligkeitswerte der Kamera sind in willkürlichen Einheiten aufgetragen und skalieren linear mit der Fluoreszenzintensität. Skalenbalken $50 \mu\text{m}$.

enz von 27 mJ/cm^2 . Dieses war auch die Fluenz, bei der eine maximale Perforationseffizienz beobachtet wurde.

Durch eine weitere Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob der Anstieg des Fluo-4 Signals durch eine Ausschüttung aus den Calciumspeichern der Zelle oder durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium verursacht wird. Die Fluenz wurde dafür auf 27 mJ/cm^2 festgesetzt und die oben beschriebenen Experimente wurden mit zwei verschiedenen Medien wiederholt. Dazu wurde einmal das zuvor verwendete Medium RPMI 1640 genutzt und einmal RPMI 1640 Medium, welches mit 5 mM EGTA versetzt wurde. EGTA ist ein Calciumchelator und bindet die freien Ca^{2+} -Ionen im Medium. Für beide Bestrahlungszeiten wurde die Abhängigkeit des Calciumsignals von dem verwendeten Medium verglichen (siehe Abb. 5.5). In der ersten Sekunde nach der Bestrahlung war der Verlauf des Calciumsignals für beide Medien im Rahmen der Messfehler identisch. Danach zeigte sich jedoch für das Medium mit EGTA ein deutlicher Signalabfall, der im Medium mit freien Ca^{2+} -Ionen erst

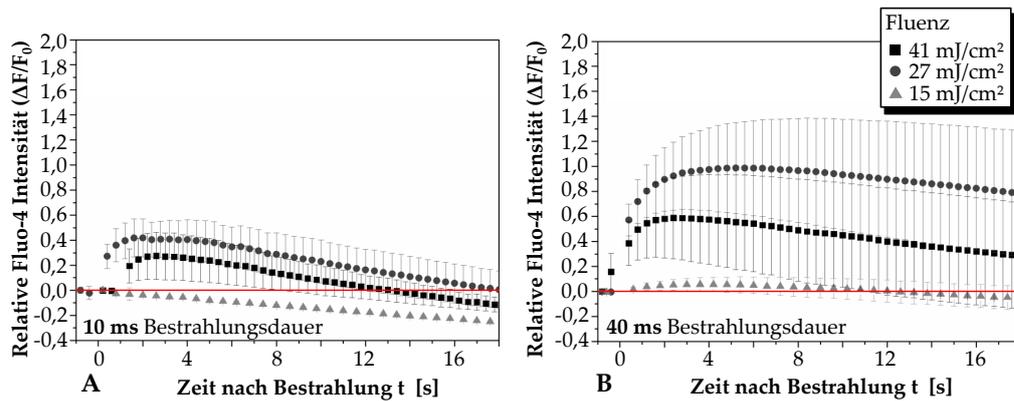


Abbildung 5.4: Zeitlicher Verlauf der Intensität des Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 nach der Laserperforation in Abhängigkeit von Bestrahlungsdauer und Fluenz (nach [103]). Bestrahlungsdauer von **A** 10 ms und **B** 40 ms. Der Zeitpunkt der Laserbestrahlung liegt bei $t = 0$ s. Die Verläufe zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit je fünf bestrahlten Zellen.

1 – 3 s später einsetzte. Damit konnte gezeigt werden, dass das intrazelluläre Calciumsignal zumindest teilweise durch Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Ca^{2+} -Speichern verursacht war. Andernfalls wäre in den Experimenten mit EGTA kein Signal messbar gewesen. Der rapide Abfall des Signals gegenüber dem Medium ohne EGTA ist möglicherweise durch Einstrom von EGTA in die perforierten Zellen zu erklären. Weiterhin konnte in beiden Medien eine zellübergreifende Calciumwelle als Reaktion auf die GNP-vermittelte Laserperforation beobachtet werden. Diese propagierte auch über nicht bestrahlte Zellen hinweg, siehe Abb. 5.3.

5.2.3 Messung des Phasenvolumens mit digitaler Holographie

Mit digitaler Holographie wurde das Verhalten der Zellen nach der GNP-vermittelten Laserperforation anhand ihres Phasenvolumens quantifiziert. Die Aufnahmen mit der digital holographischen Bildgebung erfolgten mit einer Auflösung von 1280×1024 Pixeln. Für die Interferogramme wurde ein Streifenabstand von ca. 4 Pixeln durch Verkippen der Spiegel eingestellt. Die gemessene Pixelauflösung beträgt $0.04 \mu\text{m}/\text{Pixel}$, sodass für die Phasenverteilungen höchstens eine transversale Auflösung von ca. $0.2 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ erreicht werden kann. Dies folgt aus der beschränkten Bandbreite bei der off-axis Holographie. Dort können nur Variationen der Phase mit einer Raumfrequenz größer als der Streifenabstand durch die Trägerfrequenz aufgelöst werden. In diesem Experiment war die optische Auflösung durch das verwendete Objektiv auf ca. $0.65 \mu\text{m}$ beschränkt. Zur Abschätzung der axialen Auflösung wurde die Standardabweichung des Hintergrundes bei unbestrahlten Zellen gemessen und ergab sich als $\sigma \lesssim 0.14$ rad. Diese Schwankung wurde primär durch eine Bewegung des umgebenden Mediums aufgrund der Zirkulation der Umgebungsluft verursacht. Dies entspricht einem Gangunterschied von ca. 11 nm im Medium.

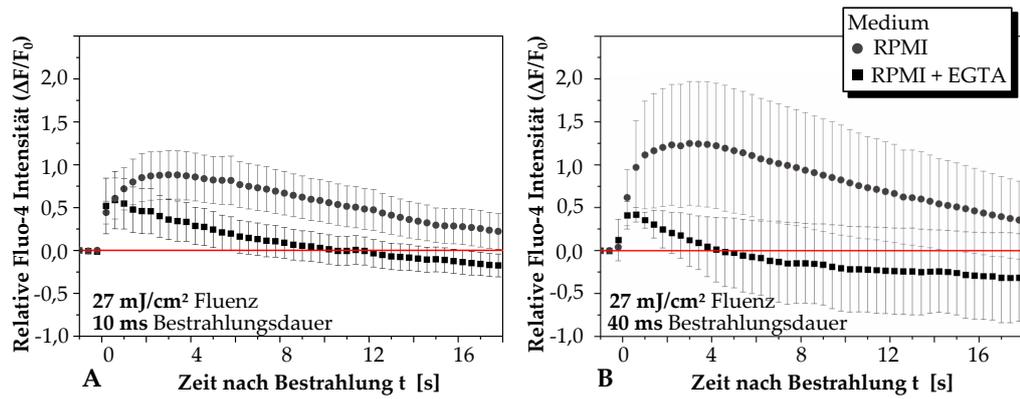


Abbildung 5.5: Zeitlicher Verlauf der Intensität des Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 nach der Laserperforation in Abhängigkeit vom Ca^{2+} -Gehalt im Medium (nach [103]). Bestrahlungsdauer von **A** 10 ms und **B** 40 ms bei fester Fluenz des Perforationsstrahls von je 27 mJ/cm^2 . Der Zeitpunkt der Laserbestrahlung liegt bei $t = 0 \text{ s}$. Als Medium wurde einmal das Zellkulturmedium RPMI verwendet und in einem zweiten Experiment das gleiche Medium mit 5 mM EGTA versetzt. EGTA ist ein Calciumchelator, welcher freie Ca^{2+} -Ionen bindet. Die Verläufe zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente mit je fünf bestrahlten Zellen.

Bei den Experimenten wurden für jede Bestrahlungsdauer und Fluenz des Parameterfeldes je 30 Zellen bestrahlt und mit digital holographischer Bildgebung gemessen. Weiterhin wurden die Experimente für eine unbestrahlte Kontrollgruppe von ebenfalls 30 Zellen wiederholt. Die Aufnahmen wurden ca. eine Sekunde vor der Bestrahlung gestartet und erfolgten mit einer Bildrate von 33 Hz für 60 s . Aus den interferometrischen Aufnahmen wurden umgebrochene Phasenverteilungen mit der Methode nach Takeda *et al.* (vgl. Abschnitt 4.1.1) berechnet. Diese wurden daraufhin mit dem SRNCP Algorithmus entfaltet. Die Aufnahmen wurden zu Zeitserien für die einzelnen Zellen und Parametersätze zusammengefasst. Von jeder Zeitserie wurde mit einem eigens dafür erstellten, halbautomatischen ImageJ Makro der Hintergrund entfernt. Dies erfolgte durch Anpassung eines zweidimensionalen parabolischen Polynoms. Dadurch wurde ein Defokus der Phasenfront korrigiert, der durch leichte Unterschiede in den Längen der Interferometerarme verursacht ist [55]. An den so vorprozessierten Datensätzen wurde nun das Phasenvolumen $V_{\text{ph}}(t)$ jeder bestrahlten Zelle als Funktion der Zeit t durch Umrandung der Zelle in ImageJ bestimmt. Das Phasenvolumen wurde auf den Mittelwert V_0 des Phasenvolumens vor der Laserbestrahlung normiert, um das *normierte Phasenvolumen* $V_{\text{ph}}(t)/V_0$ zu erhalten. Exemplarische Phasenverteilungen und Zeitverläufe des normierten Phasenvolumens sind in Abb. 5.6 gezeigt.

Für den Zeitverlauf des normierten Phasenvolumens traten zwei charakteristische Fälle auf: Entweder zeigte das Phasenvolumen einen starken, exponentiellen Volumenverlust in den ersten zehn Sekunden oder das Phasenvolumen blieb über die gesamte Messung nahezu konstant. Falls ein exponentieller Abfall stattfand, folgte darauf eine langsamere Änderung des normierten Phasenvolumens, die für die meisten Zellen zu einer weiteren Reduktion führte.

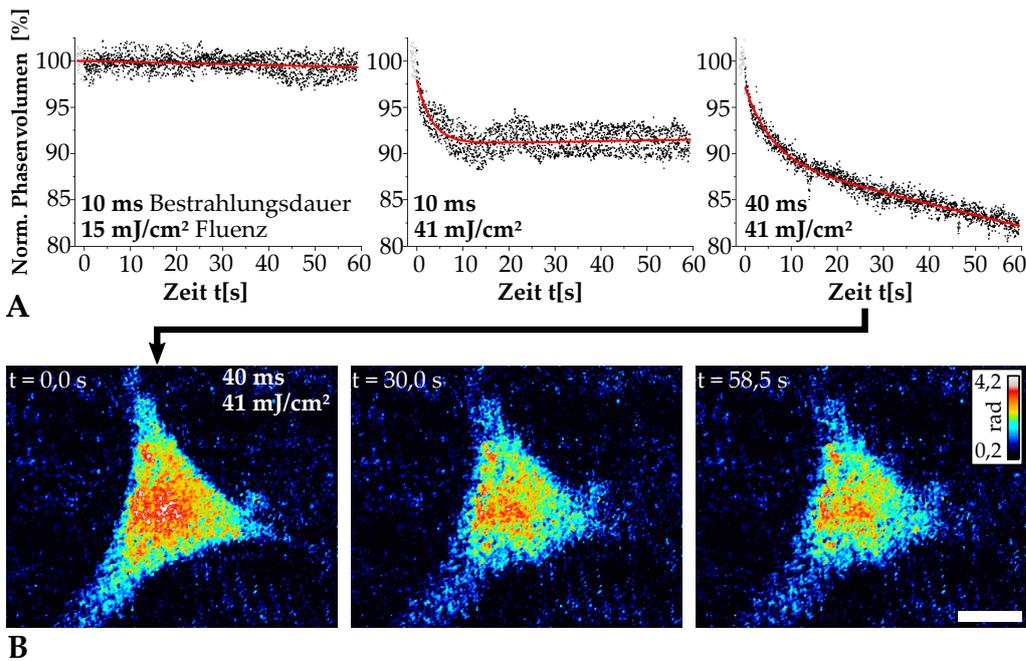


Abbildung 5.6: Bildung des Phasenvolumens der Zellen nach der Laserbestrahlung. **A** Zeitverläufe des normierten Phasenvolumens für ausgewählte Parameterkombinationen. Die Bestrahlung erfolgt zum Zeitpunkt $t = 0,0$ s. Die grauen Messpunkte zeigen das Phasenvolumen vor der Bestrahlung. Die rote Linie zeigt das Ergebnis der Anpassung einer exponentiell-linearen Modellfunktion nach Gleichung 5.1. **B** Exemplarische Zeitserie der gemessenen Phasenverteilung einer Zelle. Die Messdaten gehören zu dem Graphen mit der entsprechenden Parameterkombination aus Spalte A. Skalenbalken $10 \mu\text{m}$.

In keinem der untersuchten Fälle wurde ein exponentieller Anstieg des Phasenvolumens beobachtet. Um den Zeitverlauf des normierten Phasenvolumens auf wenige Parameter zu reduzieren und quantitativ vergleichen zu können, wurde eine Funktionsanpassung durchgeführt. Als Modellfunktion wurde eine Linearkombination aus einem exponentiellen Volumenverlust und einer linearen Funktion angesetzt:

$$V_{\text{ph}}(t)/V_0 = \underbrace{\text{const}_1 \cdot \exp\left(-\ln 2 \cdot \frac{t}{t_{1/2}}\right)}_{\text{Exponentieller Abfall}} + \underbrace{\ell \cdot t + \text{const}_2}_{\text{Lineare Änderung}}. \quad (5.1)$$

Der beobachtete, anfängliche Volumenabfall wird durch den exponentiellen Zerfallsterm der Funktion modelliert. Ein derartiger exponentieller Term kann die Veränderung des Zellvolumens aufgrund von regulatorischen Effekten oder Diffusion beschreiben [25, 96, 106]. Die Halbwertszeit des exponentiellen Terms ist gegeben durch $t_{1/2}$. Der zweite, lineare Term ist das einfachste Modell für die nachfolgende Änderung des Phasenvolumens innerhalb der Messdauer. Die Messdauer ist zu kurz, um komplexere Annahmen bezüglich dieses funktionellen Verlaufs zu unterstützen. Der lineare Änderungsparameter ℓ beschreibt die Änderung des normierten Phasenvolumens über die Zeit gegen Ende der Messdauer. Die lineare Änderung dominiert den Zeitverlauf

*Anpassung einer
Modellfunktion für das
Phasenvolumen*

des Phasenvolumens zum Ende der Messung. Damit ist insbesondere das Vorzeichen des Parameters ℓ relevant. Anhand dessen kann eine Aussage über die Richtung der Änderung des Phasenvolumens am Ende der ersten Minute nach der Laserperforation getroffen werden.

Origin 9.1
OriginLab, USA

Das Phasenvolumen von mindestens 22 der 30 bestrahlten Zellen für jeden Parametersatz wurde mit einer Funktionsanpassung nach Gl. 5.1 analysiert. Einzelne Datensätze mussten aufgrund von Bildfehlern bei der Messung oder wegen fehlerhafter Phase Unwrapping ausgeschlossen werden. Die Datenverarbeitung und Anpassung wurde mit Origin 9.1 durchgeführt. Für alle Fluenzen und Bestrahlungsdauern wurden die exponentielle Halbwertszeit $t_{1/2}$ und der lineare Änderungsparameter ℓ ausgewertet und durch Boxdiagramme dargestellt. Es ist zu beachten, dass $t_{1/2}$ nur die Halbwertszeit der Komponente des exponentiellen Volumenverlusts anzeigt und nicht die Zeit, nach der das normierte Phasenvolumen insgesamt auf die Hälfte abgefallen ist. Da nicht alle Zellen einen exponentiellen Volumenabfall zeigten, wurde zusätzlich der Anteil der Zellen mit einem solchen Verhalten angegeben. Als ein abgeleitetes Resultat wurde das normierte Phasenvolumen nach einer Minute $V_{ph}(t = 60\text{ s})/V_0$ berechnet. Die Auswertung der Größen ist in Abb. 5.7 gezeigt. Mit einem studentischen t -Test wurde zusätzlich die statistische Signifikanz der Abweichung dieser Werte gegen die Kontrollgruppe getestet. Signifikanzniveaus werden durch Sternchen wie folgt bezeichnet: $*$: $p < 0,05$, $**$: $p < 0,01$ und $***$: $p < 0,001$. Ein Resultat mit $p \geq 0,05$ wird als nicht signifikant betrachtet und mit n.s. markiert.

Für die niedrigste verwendete Fluenz von 15 mJ/cm^2 wurde keine signifikante ($p \geq 0,17$) Veränderung des normierten Phasenvolumens gegenüber der Kontrolle beobachtet. Dementsprechend wurde dort fast kein exponentieller Volumenverlust beobachtet und der lineare Änderungsparameter verschwand im Mittel (siehe Abb. 5.7 A-C). Die Zeitabhängigkeit des Phasenvolumens war nahezu identisch mit den Ergebnissen der unbestrahlten Kontrollgruppe. Für die niedrigste Fluenz konnten demnach keine dynamischen Effekte bezüglich des normierten Phasenvolumens nach der GNP-vermittelten Laserperforation beobachtet werden.

Für die Fluenzen von 27 mJ/cm^2 und 41 mJ/cm^2 wurde für beide Bestrahlungszeiten eine signifikante Verringerung ($p < 0,001$) des normierten Phasenvolumens nach einer Minute gegenüber der unbestrahlten Kontrollgruppe beobachtet (siehe Abb. 5.7 A). Bei dem linearen Änderungsparameter ℓ ergab sich nur bei der höchsten Fluenz und der Bestrahlungsdauer von 40 ms eine signifikante Änderung ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. In diesem Fall lag eine Verringerung des normierten Phasenvolumens von ca. 5 % pro Minute vor. Diese Änderung dominiert zum Ende des Messintervalls von 1 min und zeigt an, dass die Verringerung des Zellvolumens über die Messzeit hinaus anhält.

Anfängliche exponentielle Verringerungen des normierten Phasenvolumens wurden fast ausschließlich bei den beiden höchsten Fluenzen beobachtet. Für die niedrigste Fluenz zeigten nur einzelne Zellen dieses Verhalten. In Abb. 5.7 C sind die Häufigkeiten für das Auftreten eines anfänglichen exponentiellen Abfalls des Phasenvolumens unmittelbar nach der Laserperforation sowie die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ des Zerfalls dargestellt. Für eine Fluenz von 27 mJ/cm^2 zeigten bei beiden Bestrahlungsdauern mehr als 60 % der Zellen einen expo-

bestrahlten Kontrollgruppe beobachtet. Dennoch konnte durch den Einstrom von Propidiumiodid eine Perforationswahrscheinlichkeit von über 50 % nachgewiesen werden. Eine Perforation der Membran alleine war demnach nicht ursächlich für das Verhalten des Calciumsignals und des Phasenvolumens. Für den Parametersatz mit der mittleren verwendeten Fluenz von 27 mJ/cm^2 ergab sich die höchste gemessene Perforationseffizienz. Im Vergleich mit der höheren und der geringeren Fluenz lag dies darin begründet, dass bei hoher Vitalität zugleich häufig eine Membranperforation erreicht wurde.

Bezug des Calciumsignals
zum Phasenvolumen

Bei beiden Bestrahlungsdauern für die Fluenzen 27 mJ/cm^2 und 41 mJ/cm^2 wurde in der ersten Minute eine signifikante Verringerung des Phasenvolumens gegenüber der Kontrolle gemessen. Zudem wurde ein signifikantes Calciumsignal nach der Laserbestrahlung beobachtet. Zwischen der Dynamik des Phasenvolumens und des Calciumsignals ist ein Zusammenhang möglich: Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kann zu einem Einstrom von Wasser in die Zelle und somit zu einem Anschwellen der Zelle führen. In Folge dessen kann eine Verringerung des Phasenvolumens auftreten. Diese entspricht einem Anschwellen der Zelle, d.h. einem Anstieg des Zellvolumens. Dieser Effekt wurde bereits von Pavillon *et al.* bei neuronalen Zellen der Maus beschrieben [147, 148]. Die Ausschüttung von intrazellulärem Calcium ist konsistent mit den Ergebnissen der Messungen mit und ohne Zusatz des Calciumchelators EGTA. Zusätzlich zu dem Einstrom von Wasser kann ein Ausstrom von Zytoplasma aus der perforierten Membran für das Absinken des Phasenvolumens verantwortlich sein [103]. Durch einen Ausstrom von Zytoplasma würde das Zellvolumen absinken.

Die Ausschüttung von intrazellulärem Calcium kann durch eine Stressantwort der Zelle ausgelöst werden. Diese könnte als Folge der Erhitzung der Nanopartikel oder als Folge des Perforationsprozesses selbst auftreten und den IP_3 (Inositol 1,4,5-triphosphat) Signalweg auslösen [28, 122, 174]. Dieser Signalweg verursacht die Ausschüttung von intrazellulärem Calcium. Weiterhin könnte das IP_3 durch Gap Junctions zwischen den Zellen weitergegeben werden und dadurch die beobachtete zellübergreifende Calciumwelle erklären [75, 122, 160]. Auch ein parakriner Signalweg mit Adenosintriphosphat (ATP) als Botenstoff könnte eine extrazelluläre Calciumwelle auslösen [75]. Diese Ergebnisse und die Analyse werden in Kapitel 7.2 im Hinblick auf ihre Bedeutung für die GNP-vermittelte Laserperforation diskutiert.

5.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES KAPITELS

In diesem Kapitel wurde die Entwicklung eines multimodalen Bildgebungs- und Laserperforations-Aufbaus sowie die Untersuchung von morphologischen und biophysikalischen Parametern von Zellen als Reaktion auf die GNP-vermittelte Laserperforation vorgestellt. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte experimentelle Aufbau ermöglicht die Fluoreszenzbildgebung und quantitative Phasenbildgebung mit digitaler Holographie sowie die Inkubation und Perforation von adhärennten Zellen in Kulturschalen. Die digitale Holographie erfolgt dabei in einer off-axis Konfiguration mit einem Michelson-Interferometer. Für die Zellperforation wird ein Pikosekundenlaser mit einer Zentralwellen-

länge von 532 nm und einer Repetitionsrate von 20,25kHz eingesetzt, welcher auch in der etablierten Technik der GNOME Laserperforation verwendet wird.

Mit diesem Aufbau wurde erstmalig das Verhalten von Zellen als komplexes biophysikalisches System auf die GNP-vermittelte Laserperforation untersucht. Dazu wurde ein Parameterfeld aus drei Fluenzen (15, 27 und 41 mJ/cm²) für die Perforationsstrahlung und zwei Bestrahlungszeiten (10, 40 ms) definiert. Während üblicherweise nur Vitalität und Perforationseffizienz in Abhängigkeit von diesen Parametern analysiert werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit darüber hinaus weitere Parameter untersucht: Mit der digitalen Holographie wurde das Phasenvolumen der Zellen in der ersten Minute nach der Perforation quantifiziert. Dieses ist durch die Trockenmasse und das Volumen mit der Morphologie der Zellen verknüpft. Mittels Fluoreszenzbildgebung wurde außerdem die Dynamik der Calciumkonzentration innerhalb der Zellen in den ersten 18 s nach der Perforation gemessen. Für die niedrigste Fluenz und Bestrahlungsdauer konnte eine Membranperforation in mehr als 50 % der untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Signifikante Effekte bezüglich des Calciumsignals und des Phasenvolumens gegenüber unbestrahlten Kontrollgruppen wurden jedoch nicht beobachtet. Für die höheren Fluenzen zeigte sich ein deutliches Calciumsignal der Zellen, welches in den ersten Sekunden anstieg und danach langsam abfiel. In weiteren Versuchsreihen wurde nachgewiesen, dass dieses Signal zumindest teilweise durch Ausschüttung von intrazellulärem Calcium verursacht wurde und dass eine Signalausbreitung auf benachbarte, nicht bestrahlte Zellen erfolgte. Für das Phasenvolumen wurde bei diesen Parametern in fast allen Fällen eine Verringerung beobachtet. Die Dynamik des Phasenvolumens zeigte eine langsame, fast lineare Änderung innerhalb der ersten Minute, welche für einen Teil der Fälle von einem anfänglichen exponentiellen Abfall überlagert war. Dies könnte durch ein Anschwellen der Zelle aufgrund eines osmotischen Zustroms von Wasser als Folge einer intrazellulären Ausschüttung von Ca Ionen verursacht sein. Ein weiterer möglicher Grund ist ein Ausstrom von Zytoplasma durch die perforierte Zellmembran. Weiterhin konnte nach der Bestrahlung eine interzelluläre Calciumwelle beobachtet werden. Diese zeigt an, dass eine Zell-Zell Kommunikation stattfindet.

ENTWICKLUNG UND EVALUIERUNG NEUER PHASE UNWRAPPING ALGORITHMEN

NEUE Algorithmen zum kachelbasierten Phase Unwrapping wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und werden in diesem Kapitel vorgestellt. Es wurden ein neuartiger Kachel-Unwrapper und ein Kachel-Merger entwickelt, welche existierende Algorithmen signifikant erweitern. Diese Algorithmen werden zu Beginn des Kapitels in Abschnitt 6.1 beschrieben. Ein modulares C++ Framework, welches als freie Software veröffentlicht wurde, diente als Basis zur Implementation dieser und weiterer Algorithmen. In Abschnitt 6.2 werden die Algorithmen an synthetischen und realen Daten evaluiert und mit bestehenden Lösungsansätzen verglichen. Weiterhin werden die Algorithmen bezüglich ihrer Laufzeitkomplexität analysiert. Das Kapitel schließt mit einer Zusammenfassung.

6.1 ENTWICKLUNG NEUER PHASE UNWRAPPING ALGORITHMEN

Im folgenden werden ein Kachel-Unwrapper und ein Kachel-Merger Algorithmus präsentiert, welche im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden. Diese lassen sich mit beliebigen anderen Kachel-Merger, bzw. Kachel-Unwrapper Algorithmen zu einer Vielzahl von kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen kombinieren.

6.1.1 Modellbasierter Kachel-Unwrapper (MLSQU)

Der hier beschriebene Algorithmus zur Entfaltung der umgebrochenen Phasenverteilung ϕ_w innerhalb einer Kachel nutzt das Prinzip von Lemma 4.1. Die Funktionsweise basiert auf der Anpassung einer Modellfunktion f an den Gradienten der Phasenverteilung. Durch Verwendung eines linearen Algebra Formalismus, der Linearkombinationen von beliebigen Basisfunktionen als Modellfunktion erlaubt, wird ein neuer Lösungsansatz präsentiert.

Im Folgenden sei das diskrete Koordinatensystem innerhalb einer Kachel durch (x, y) gegeben. Als Modellfunktion wird ein Ansatz aus einer Linearkombination von N_B Basisfunktionen $v_l : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$ gemacht:

$$f(x, y, \vec{c}, \rho) = \rho + \sum_{l=1}^{N_B} c_l \cdot v_l(x, y). \quad (6.1)$$

Dabei sind $c_l \in \mathbb{R}$, $l = 1, \dots, N_B$ die Entwicklungskoeffizienten der Linearkombination und $\vec{c} = (c_l)_{l=1, \dots, N_B}$ der zugehörige Koeffizientenvektor. Die Funktionen $v_l(x, y)$ müssen einmal differenzierbar sein und sollen nicht konstant sein. Damit ist ein konstanter Versatz der Funktion f ohne Beschränkung der Allgemeinheit allein durch den Koeffizienten $\rho \in \mathbb{R}$ gegeben.

Für die Berechnung der Entwicklungskoeffizienten wird ein Matrixformalis-

*Berechnung der
Entwicklungskoeffizienten*

mus verwendet. Zur Vereinfachung der Notation wird der Doppelindex (x, y) für die Position innerhalb einer Kachel durch einen einfachen Index k ersetzt. Das Ersetzen erfolgt dabei durch eine eindeutige Abzählung der Positionen, sodass sich $k = 1, \dots, N_\tau$ ergibt, wobei $N_{\tau \times x}$ die Anzahl der Pixel in einer Kachel τ ist. Nun wird jede Funktion $F(x, y)$ als $F(k)$ geschrieben. Die Wahl der Entwicklungskoeffizienten \vec{c} soll die Differenz von dem Gradienten der Modellfunktion und dem Gradienten der Phase innerhalb der Kachel minimieren. Die Minimierung erfolgt mit der Methode der kleinsten Quadrate, sodass gefordert wird [57]:

$$\chi^2(\vec{c}) := \sum_{k=1}^{N_\tau} \|\vec{\delta} f(k, \vec{c}) - \mathcal{W}(\vec{\delta} \phi_w(k))\|_2^2 \rightarrow \min. \quad (6.2)$$

Dieses Minimierungsproblem wird durch Einführung einer Matrix \underline{G} und eines Vektors \vec{a} wie folgt formuliert:

$$\begin{aligned} \chi^2(\vec{c}) &= \|\underline{G} \cdot \vec{c} - \vec{a}\|_2^2 \rightarrow \min. \\ \underline{G} &:= \begin{pmatrix} \underline{G}_x \\ \underline{G}_y \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^{N_B \times 2N_{\tau \times x}} \text{ mit } (\underline{G}_{x,y})_{kl} := \delta_{x,y} v_l(k) \\ \vec{a} &:= \begin{pmatrix} \vec{a}_x \\ \vec{a}_y \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^{2N_{\tau \times x}} \text{ mit } (\vec{a}_{x,y})_k := \mathcal{W}(\delta_{x,y} \phi_w(k)). \end{aligned}$$

Hier ist $N_{\tau \times x}$ die Gesamtzahl der Bildpunkte innerhalb einer Kachel. Weiterhin enthält die *Gradientenmatrix* \underline{G} die Gradienten der Basisfunktionen v_l in x - und y -Richtung für alle Koordinaten der Kachel. Der Vektor \vec{a} enthält den Gradienten der Phase an jeder Position innerhalb der Kachel nach Gleichung 4.11. Der Komponentenvektor \vec{c} , der das Minimierungsproblem 6.2 löst, ist durch die Pseudoinverse \underline{G}^\dagger der Gradientenmatrix eindeutig gegeben [180]:

$$\vec{c} = \underline{G}^\dagger \cdot \vec{a} = (\underline{G}^T \underline{G})^{-1} \underline{G}^T \cdot \vec{a}. \quad (6.3)$$

Für eine numerische Implementation wird die Lösung dieser Gleichung durch die Singulärwertzerlegung (engl. *singular value decomposition*, kurz: SVD) der Gradientenmatrix \underline{G} berechnet. Dieses Vorgehen ist äquivalent zur Gleichung 6.3, zeichnet sich jedoch durch eine höhere numerische Stabilität aus [57].

Während der Vektor \vec{a} für jede Kachel neu berechnet werden muss, ist dies für die Gradientenmatrix \underline{G} nicht notwendig. Grund dafür ist, dass die Matrix nur aus den Gradienten der Basisfunktionen v_l an jeder Position einer Kachel besteht. Daher ist für einen festen Satz von Basisfunktionen die Gradientenmatrix nur abhängig von den Dimensionen der Kachel. Sind die Dimensionen zweier Kacheln gleich, dann ist die Gradientenmatrix identisch. Also kann auch dieselbe Singulärwertzerlegung zur Lösung von Gleichung 6.3 verwendet werden. Für eine Aufteilung der umgebrochenen Phasenverteilung, wie sie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben ist, liegen maximal vier verschiedene Kachelgeometrien vor, sodass die Gradientenmatrix nur höchstens vier Male berechnet

werden muss. Wird die umgebrochene Phasenverteilung in Kacheln mit identischer Geometrie aufgeteilt, dann muss die Gradientenmatrix sogar nur einmal berechnet werden. In diesem Fall erreicht die Berechnung maximale Effizienz.

Nach der Berechnung des Koeffizientenvektors \vec{c} ist die Modellfunktion für die entfaltete Phase bis auf die Konstante ρ bekannt. Falls die entfaltete Phase ϕ_u bis auf eine Konstante identisch mit der Modellfunktion f ist, so ist der Wert von ρ unerheblich. Jedoch sollen auch Modellfunktionen zugelassen werden, die einen simpleren Verlauf als die entfaltete Phase besitzen, solange sie den Bedingungen in Lemma 4.1 genügen. Daher wird diese Forderung nicht gemacht und die Konstante ρ in einem zweiten Berechnungsschritt bestimmt. Dazu wird zunächst eine Differenzphase berechnet, bei der die Modellfunktion von der umgebrochenen Phase subtrahiert wird:

$$\phi_{\text{diff}}(x, y) := \mathcal{W}(\phi_w(x, y) - f(x, y, \vec{c}, \rho = 0)).$$

Diese Phase wird dann mit dem BLS-Unwrapping Algorithmus entfaltet (vgl. Abschnitt 4.2.5.2). Die resultierende Konstante ρ ist der gesuchte konstante Versatz der Modellfunktion.

Der vorgestellte Kachel-Unwrapping Algorithmus wird als MLSQU Kachel-Unwrapper (engl. *model-based least squares unwrapper*) bezeichnet. Wird eine konstante Modellfunktion $f(x, y) = \rho$ angesetzt, dann ist der MLSQU Algorithmus identisch mit dem BLS Algorithmus. Der MLSQU Kachel-Unwrapper enthält somit den BLS Kachel-Unwrapper als einen Spezialfall.

6.1.2 Qualitätsgesteuerter Kachel-Merger (τSRNCP)

Basierend auf dem Grundprinzip des pixelbasierten SRNCP-Unwrappers wurde ein Kachel-Merger, genannt τSRNCP , entwickelt. Der pixelbasierte SRNCP Algorithmus verfährt in zwei getrennten Schritten (vgl. Abschnitt 4.2.5.1):

1. *Berechnung der Kanten-Verlässlichkeit:* Für alle Kanten zwischen Pixeln wird ein Verlässlichkeitswert berechnet.
2. *Iteratives Entfalten der Kanten:* Die Kanten werden nach absteigender Verlässlichkeit sortiert und die zugehörigen Pixel iterativ entfaltet und zu Gruppen zusammengefasst.

Der zweite Schritt wird auf einfache Weise zu einem kachelbasierten Prinzip verallgemeinert, indem die Pixel durch Kacheln ersetzt werden. Für diesen Schritt ist das pixelbasierte Prinzip ein Spezialfall des kachelbasierten Algorithmus mit einer Kachelgröße von genau einem Pixel. Liegt eine Berechnung der Kanten-Verlässlichkeit zwischen Kacheln vor, so läuft dieser Schritt des Entfaltens von Kanten und des Gruppierens von Kacheln analog zu Algorithmus 4.1 ab. Allerdings erfolgt die Berechnung der Kanten-Verlässlichkeit beim pixelbasierten SRNCP Algorithmus mit Hilfe der zweiten Ableitungen der Phase. So können rauscharme Bereiche identifiziert werden und mit hoher Verlässlichkeitswert bewertet werden [87]. Die diskrete Ableitung ist jedoch eine fundamental pixelbasierte Größe. Werden die Pixel durch Kacheln ersetzt, ist es nicht möglich, dieses Maß auf ein kachelbasiertes Prinzip zu übertragen. Daher muss eine neue Definition der Kanten-Verlässlichkeit gefunden werden.

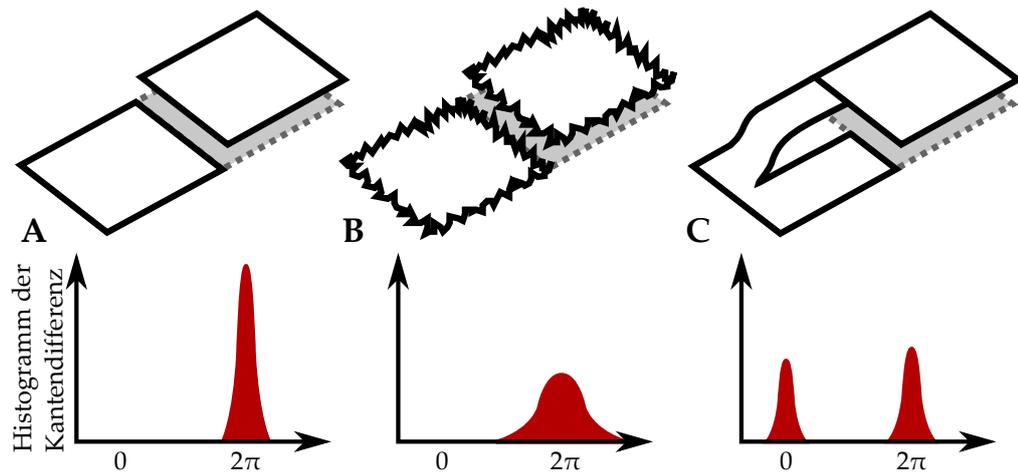


Abbildung 6.1: Verhalten der Kantendifferenzen bei einem Phasensprung in verschiedenen Spezialfällen. Schematisch gezeigt ist ein 2π Sprung an einer Kante zwischen zwei Kacheln. Darunter ist die Verteilung der zugehörigen Menge \mathcal{D} der Kantendifferenzen skizziert. **A** Phasensprung ohne Rauschen und Fehler. Die Kantendifferenzen sind mit wenig Streuung um die Sprunghöhe von 2π verteilt. Eine endliche Breite der Verteilung ergibt sich durch das diskrete Sampling. **B** Verrauschte Kante mit einem Phasensprung. Die Kantendifferenzen sind mit großer Streuung um die Sprunghöhe von 2π verteilt. **C** Die untere Kachel ist aufgrund eines Residuums fehlerhaft entfaltet. Eine Teilregion schließt ohne Phasensprung an die nächste Kachel an, eine andere Teilregion zeigt einen Phasensprung. Die zugehörige Verteilung zeigt Häufungen um die Werte 0 und 2π .

Im Folgenden werden zunächst verschiedene Szenarien an den Kanten von benachbarten Kacheln analysiert. Daraus wird eine Reihe von Forderungen für die Kanten-Verlässlichkeit abgeleitet und schließlich ein Verfahren zur Berechnung dieser Größe angegeben.

*Analyse und Aussagekraft
der Kantendifferenzen*

Das Verhalten der Menge der Kantendifferenzen (siehe Abschnitt 4.2.3.1) wird für drei exemplarische Fälle betrachtet, um daraus eine Vorschrift zur Berechnung der Verlässlichkeit abzuleiten. In Abbildung 6.1 sind die diskutierten Fälle schematisch illustriert. Zuerst wird der Fall betrachtet, dass das Kachel-Unwrapping erfolgreich ist. Das bedeutet, dass auf jeder Kachel eine entfaltete Phasenverteilung vorliegt. Gehen zwei Kacheln ohne Phasensprung ineinander über, dann ist die mittlere Kantendifferenz nahe 0. Abweichungen von diesem exakten Wert ergeben sich nur durch das diskrete Sampling. Solche kontinuierlichen Übergänge sollten mit hoher Verlässlichkeit bewertet werden. Aber auch Kanten \mathcal{J}_{AB} mit mittleren Kantendifferenzen, die Vielfachen von $\pm 2\pi$ entsprechen, sollten eine hohe Verlässlichkeit haben (siehe Abb. 6.1 A). Denn auch diese Kanten lassen sich eindeutig durch Addition von Vielfachen von $\pm 2\pi$ entfalten. Daraus wird folgende Forderung abgeleitet:

Forderung 1: Eine Kante \mathcal{J}_{AB} mit einer mittleren Kantendifferenz von 0 soll eine hohe Verlässlichkeit haben. Weiterhin soll die Verlässlichkeit invariant unter Addition von Vielfachen von $\pm 2\pi$ sein.

Im zweiten betrachteten Spezialfall liegt eine verrauschte Phasenverteilung vor, beispielsweise aufgrund von Abschattungen, niedrigem SNR oder Speckle in den interferometrischen Messdaten. Während für ideale Kanten ohne Rauschen die Verteilung der Differenzen in der Regel eng um ein Vielfaches von $\pm 2\pi$ konzentriert ist, verbreitert sich diese Verteilung in Gegenwart von Rauschen (siehe Abb. 6.1 A,B). Diese Kanten sollen als weniger verlässlich bewertet werden, als solche bei denen die Kantendifferenzen stark konzentriert sind. Als dritter Fall werden Effekte von Residuen an Kanten von Kacheln analysiert. Diese führen dazu, dass Teile einer Kante von Nachbarkacheln stetig ineinander übergehen, während eine andere Region einen Phasensprung zeigt (siehe Abb. 6.1 C). Statt einer Verteilung um genau einen Wert, zeigt die Verteilung der Menge der Kantendifferenzen eine Konzentration um zwei oder mehr Werte. Auch in diesem Fall soll der entsprechenden Kante eine geringe Verlässlichkeit zugeordnet werden. Aus beiden zuvor betrachteten Fällen leitet sich folgende Forderung ab:

Forderung 2: Eine Kante soll eine hohe Verlässlichkeit haben, wenn die Menge der Kantendifferenzen um genau einen Wert stark konzentriert ist.

Eine Größe, anhand derer die Verlässlichkeit einer Kante \mathcal{J}_{AB} in Übereinstimmung mit den obigen Forderungen quantifiziert werden kann, ist die Varianz V_{AB} der Menge der Kantendifferenzen:

Varianz als Maß für die Verlässlichkeit von Kanten

$$V_{AB} := \text{Varianz}(\mathcal{D}(\mathcal{J}_{AB})).$$

Je niedriger die Varianz ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass die betreffende Kante dem Idealfall eines eindeutigen Phasensprungs entspricht (siehe Abb. 6.1 A). In einer vom Autor betreuten Bachelorarbeit wurden verschiedene Definitionen der Kanten-Verlässlichkeit systematisch untersucht [177]. Darin konnte gezeigt werden, dass die Varianz der Kantendifferenzen ein geeignetes Maß für die Verlässlichkeit ist. Es liegt also nahe, die Verlässlichkeit einer Kante als $(V_{AB})^{-1}$ zu definieren; tatsächlich kann aber eine bessere Definition auf Basis der Varianz gefunden werden. Diese zeigt überlegene Eigenschaften in Anwesenheit von Residuen in der umgebrochenen Phasenverteilung.

Nachfolgend wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Berechnungsvorschrift für die Verlässlichkeit von Kanten angegeben. Dazu wird zunächst die Verlässlichkeit $R(\tau_A)$ einer Kachel wie folgt definiert:

Definition der Verlässlichkeit von Kacheln und Kanten

$$R(\tau_A) = \left(\frac{1}{M_N} \cdot \sum_{\tau_N} V_{AN} \right)^{-1}$$

Dabei sind die Kacheln τ_N die nächsten Nachbarn der betrachteten Kachel τ_A und M_N ist die Anzahl dieser Nachbarn. Die Verlässlichkeit einer Kachel ist also das Inverse des Mittelwertes der Varianzen aller ihrer Kanten. Eine Kachel, deren Kanten sämtlich eine niedrige Varianz aufweisen, besitzt eine hohe Verlässlichkeit. Für die Verlässlichkeit einer Kachel τ gilt $R(\tau) \in (0, \infty)$. Für die Implementation in ein Computerprogramm ist die Verlässlichkeit nach oben durch den Typ der Fließkommavariablen beschränkt. Die Verlässlichkeit einer Kante $R(\mathcal{J}_{AB})$ wird nun schließlich als Produkt der Verlässlichkeiten der zugehörigen Kacheln definiert:

$$R(\mathcal{J}_{AB}) = R(\tau_A) \cdot R(\tau_B).$$

Diese Definition der Verlässlichkeit wirkt zunächst umständlich gegenüber der simplen Variante, die Kanten-Verlässlichkeit als $R(\mathcal{J}_{AB}) = (V_{AB})^{-1}$ zu definieren. Dennoch ist die Komplexität der Berechnung nur unwesentlich erhöht, da die Varianz jeder Kante in beiden Methoden nur einmal berechnet werden muss. Die anschließende Mittelwertbildung ist mit sehr geringem Rechenaufwand verbunden. Auf diese Weise enthält die Kanten-Verlässlichkeit nicht nur Informationen über die Güte der betreffenden Kante sondern zusätzlich auch über die Güte aller Kanten der beteiligten Kacheln.

Im zweiten Schritt verfährt der τ SRNCP-Merger analog wie der pixelbasierte SRNCP Phase Unwrapping Algorithmus, indem Kanten in absteigender Reihenfolge der Verlässlichkeit entfaltet und gruppiert werden (vgl. Algorithmus 4.1 in Abschnitt 4.2.5). Das Prinzip des Zusammenfügens von Pixeln, beziehungsweise Kacheln, ist demnach in beiden Algorithmen identisch. Der fundamentale Unterschied zwischen beiden Algorithmen liegt in der Definition der Verlässlichkeit. Erstens lässt sich die pixelbasierte Verlässlichkeit nicht einfach auf Kanten zwischen Kacheln übertragen. Zweitens basiert die hier gegebene Kanten-Verlässlichkeit auf Überlegungen, die nur für Kanten zwischen Kacheln eine Bedeutung haben. Die kachelbasierte Verlässlichkeit kann nicht für Kanten mit weniger als drei Pixeln angewendet werden, da dort der Begriff der Varianz nicht definiert ist. Obwohl die Algorithmen eng miteinander verwandt sind, kann der SRNCP Algorithmus daher nicht als Spezialfall des τ SRNCP-Mergers angesehen werden.

6.2 EVALUIERUNG UND ANALYSE DER PHASE UNWRAPPING ALGORITHMEN

Die Güte des Phase Unwrappings der vorgestellten Algorithmen wurde quantifiziert und mit bestehenden Algorithmen verglichen. Dazu wurde ein modulares C++ Framework entwickelt, in welchem die zuvor beschriebenen Algorithmen implementiert wurden. Ebenso wurde der der pixelbasierte SRNCP Algorithmus sowie der BLS Kachel-Unwrapper und der BLS Merger implementiert. Das Programm abstrahiert die Objekte, die für das kachelbasierte Phase Unwrapping nötig sind, wie Kacheln, Kachel-Unwrapper und Merger. Schnittstellen zwischen diesen Objekten ermöglichen das Erstellen von kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen nach einem modularen Prinzip. Der Quellcode wurde als freie Software veröffentlicht (<https://github.com/gc-ant/digiholo2D>).

Zur Analyse und Validierung wurden kachelbasierte Phase Unwrapping Algorithmen nach dem Baukastensystem aus den implementierten Kachel-Unwrappern und Mergern zusammengesetzt. So wurden verschiedene Kombinationen von Kachel-Unwrappern und Kachel-Mergern im Hinblick auf die Qualität ihrer Resultate untersucht. Dafür wurden die im Rahmen in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen MLSQU und τ SRNCP mit dem kachelbasierten BLS Algorithmus von Strand *et al.* und mit dem pixelbasierten SRNCP Algorithmus von Herráez *et al.* verglichen. Die Algorithmen wurden sowohl mit synthetischen Phasenverteilungen als auch mit Messdaten aus der digitalen Holographie getestet.

6.2.1 Modellfunktion für den MLSQU Kachel-Unwrapper

Als Modellfunktion für den MLSQU Kachel-Unwrapper wurde eine polynomielle Funktion der Form

$$f_P(x, y) = \rho + \sum_{m=0}^P \sum_{n=0}^P c'_{mn} \cdot x^m \cdot y^n \quad , (m, n) \neq (0, 0) \quad (6.4)$$

angesetzt. Hier ist P die höchste Potenz in den Koordinaten x und y , sodass das zweidimensionale Polynom f_P den Grad $2P$ besitzt. Die Bedingung $(m, n) \neq (0, 0)$ garantiert, dass der konstante Versatz des Polynoms nur durch den Wert ρ festgelegt wird. Die Koeffizienten c'_{mn} werden sequentiell in einen eindimensionalen Koeffizientenvektor (c_1) geschrieben, wobei $m = (l \bmod P)$, $n = \lfloor l/P \rfloor$. Dieser Koeffizientenvektor besitzt $(P^2 + 2P)$ Elemente. Durch diese Indizierung ist f_P als Linearkombination von Basisfunktionen in der Form 6.1 gegeben und kann als Modellfunktion für den MLSQU Algorithmus verwendet werden. Die polynomielle Form wird gewählt, da sie als Taylorreihe einer entfalteten Phasenverteilung aufgefasst werden kann. Analytische Funktionen lassen sich durch eine Taylorreihe beliebig nahe approximieren [134]. Eine polynomielle Modellfunktion stellt somit eine plausible Näherung einer unbekannt Phasenverteilung dar.

6.2.2 Anwendung auf synthetische Phasenverteilungen mit Rauschen

Auf einem quadratischen Raster (x, y) von $N_x \times N_y = 600 \times 600$ Pixeln wurde eine synthetische Phasenverteilung ϕ_u generiert. Als Funktion wurde die Überlagerung zweier gaußscher Profile wie folgt angesetzt:

$$\begin{aligned} \phi_u(x, y) = & 4\pi \cdot \exp\left(-\frac{(x-1-\frac{1}{3}N_x)^2 + (y-1-\frac{1}{3}N_y)^2}{2 \cdot (6N)^2}\right) \\ & + 8\pi \cdot \exp\left(-\frac{(x-1-\frac{2}{3}N_x)^2 + (y-1-\frac{2}{3}N_y)^2}{2 \cdot (8N)^2}\right). \end{aligned} \quad (6.5)$$

Dies ist eine entfaltete Phasenverteilung im Sinne der Definition 4.1. Gaußprofile werden häufig als synthetische Phasenverteilungen zum Test von Phase Unwrapping Algorithmen eingesetzt [181, 44, 2]. Die spezielle Form der Funktion ist willkürlich gewählt; es ist zu beachten, dass eine Gaußfunktion nicht durch eine endliche Polynomreihe beschrieben werden kann. Das bedeutet, dass das Kachel-Unwrapping mit dem MLSQU-Unwrapper und polynomieller Modellfunktion nicht trivial ist.

Aus der synthetischen Phasenverteilung nach 6.5 werden verrauschte Phasenverteilungen ϕ_u^σ mit der Vorschrift $\phi_u^\sigma(x, y) := \phi_u(x, y) + \mathcal{N}_\sigma(x, y)$ generiert. Dabei ist \mathcal{N}_σ ein weißes gaußsches Rauschen mit Mittelwert 0 und Standardabweichung σ . Schließlich werden daraus synthetische gefaltete Phasenverteilungen $\phi_w^\sigma(x, y) := \mathcal{W}(\phi_u^\sigma)$ berechnet. Durch die Addition von weißem Rauschen entstehen Residuen in der Phasenverteilung, weil benachbarte Pixel eine zulässige Phasendifferenz von π überschreiten können. Die Häufigkeit des Auftretens dieser Residuen ist von der Standardabweichung σ der Rauschverteilung abhängig. Die Phase ϕ_u^σ ist in solchen Fällen keine entfaltete Phase im

*Erstellung verrauschter
Phasenverteilungen*

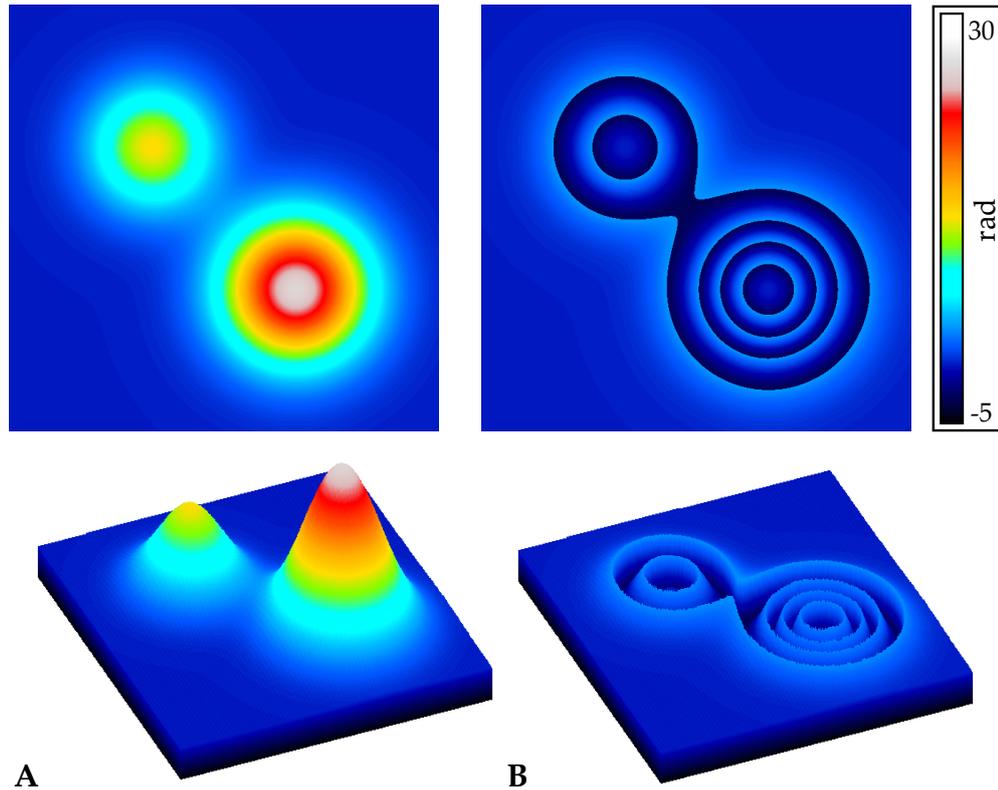


Abbildung 6.2: Darstellung der synthetischen Phasenverteilung, welche nach Gleichung 6.5 erstellt wurde. Spalte **A** zeigt die entfaltete Phasenverteilung in 2D Falschfarben und einer 3D Ansicht. In Spalte **B** ist die zugehörige umgebrochene Phasenverteilung dargestellt. Das diskrete Raster hat eine Auflösung von 600×600 Pixeln.

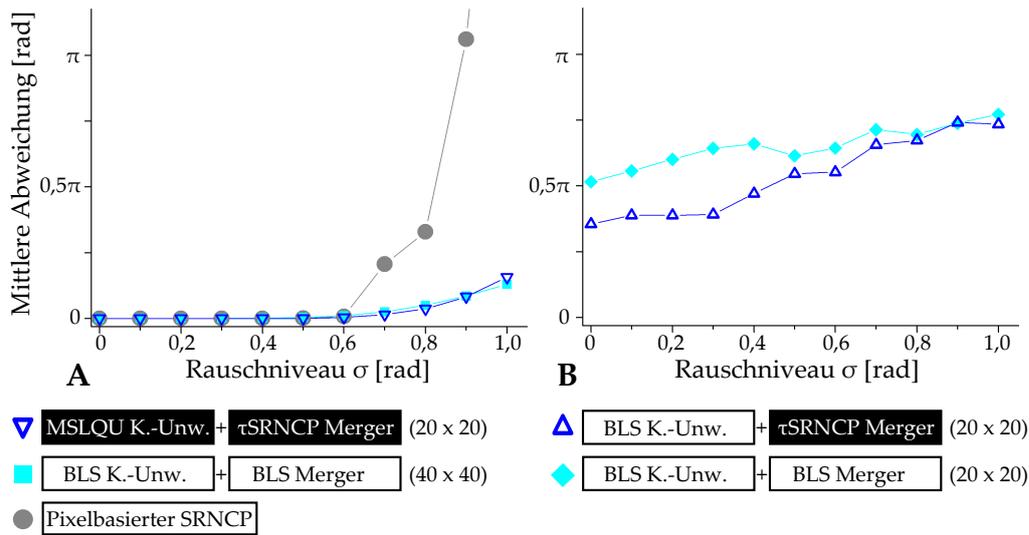
Sinne von Definition 4.1. Ohne Zusatzannahmen lässt sich die Verteilung ϕ_u^σ nicht mehr aus der Verteilung ϕ_w^σ berechnen. Dennoch kann, wie nachfolgend beschrieben, die Robustheit von Phase Unwrapping Algorithmen gegenüber einem gehäuften Auftreten von Residuen quantifiziert werden [182]. Obwohl weißes Rauschen kein allgemeines Modell für Rauschverteilungen in realen Anwendungen ist, können vergleichbare Gegebenheiten auftreten, wenn die interferometrischen Daten mit niedrigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgenommen wurden oder Abschattungen vorliegen [182, 76, 44, 68].

Quantifizierung der Güte
einer numerisch entfalteten
Phase

Um den Unterschied zwischen dem Ergebnis $\phi_u^{\sigma, \text{alg}}$ eines Phase Unwrapping Algorithmus und der synthetischen entfalteten Phasenverteilung ϕ_u^σ zu quantifizieren, wurde die Abweichung Δ der Verteilungen berechnet als

$$\Delta = \frac{1}{N_{\text{px}}} \sqrt{\sum_{x,y} \left(\phi_u^{\text{alg}, \sigma}(x,y) - \phi_u^\sigma(x,y) - \mu \right)^2},$$

mit dem Mittelwert der Differenzen $\mu = \langle \phi_u^{\text{alg}, \sigma} - \phi_u^\sigma \rangle$. N_{px} ist die Gesamtzahl der Pixel der Phasenverteilung. Dieses Qualitätsmaß entspricht der Standardabweichung der pixelweise berechneten Differenzen zwischen dem Resultat des Algorithmus und der zugrundeliegenden Phasenverteilung [182]. Die Abweichung Δ zweier Phasenverteilungen ist also genau dann 0, wenn die Verteilungen pixelweise identisch sind bis auf einen globalen Versatz.



Abbildungung 6.3: Mittlere Abweichung des Phase Unwrappings von der originalen, ver-rauschten Phasenverteilung (modifiziert nach [7]). Dabei ist σ die Standardabweichung des additiven weißen gaußschen Rauschens. Die in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen sind in schwarzen Kästen dargestellt, andere in weißen Kästen. Die Aufteilung in Kacheln ist in Klammern angegeben. **A** Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen mit bestehenden Algorithmen. Für die kachelbasierten Algorithmen ist $N_p = 40$ angesetzt und beim MSLQU Kachel-Unwrapper zusätzlich eine Polynomordnung $P = 2$. Bei $\sigma = 1,0$ rad ist die mittlere Abweichung des SRNCP Algorithmus mit 7,5 rad außerhalb des dargestellten Bereichs. **B** Vergleich von Merging Algorithmen für fehlgeschlagene Entfaltungen von Kacheln (Beschreibung im Text auf Seite 80). Mit einer Aufteilung in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln ist die notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Entfaltung mit dem BLS Kachel-Unwrapper nicht für alle Kacheln erfüllt, da einige Kacheln mehr als einen Phasensprung enthalten.

Die Standardabweichung σ des weißen gaußschen Rauschens wurde in dem Intervall $[0, 1]$ in Schritten von 0,1 rad variiert. Für jeden Wert von σ wurden 25 Phasenverteilungen mit additivem Rauschen \mathcal{N}_σ erstellt. Für jeden verwendeten Algorithmus wurde die mittlere Abweichung $\bar{\Delta}$ der 25 Verteilungen über der Standardabweichung σ des weißen Rauschens aufgetragen, siehe Abb. 6.3. Für das Phase Unwrapping wurden verschiedene Kombinationen von kachelbasierten Algorithmen sowie der pixelbasierte SRNCP Algorithmus verwendet. Diese Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

Mit einer Aufteilung in $N_\tau = 40 \times 40$ Kacheln wurde der BLS Algorithmus, bestehend aus BLS Kachel-Unwrapper und BLS Merger, auf die umgebrochenen Phasenverteilungen angewandt. Diese Aufteilung ist so gewählt, dass in jeder Kachel höchstens ein Phasensprung vorhanden ist. Damit ist die notwendige Voraussetzung für einen erfolgreichen Unwrap mit dem BLS Kachel-Unwrapper erfüllt (vgl. Abschnitt 4.2.5.2). Damit verglichen wurde der pixelbasierte SRNCP Algorithmus sowie der in dieser Arbeit entwickelte kachelbasierte Algorithmus bestehend aus MSLQU Kachel-Unwrapper und τ SRNCP Merger mit einer Aufteilung in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln und einer Polynomord-

nung $P = 2$ (siehe Abb. 6.3 A und Abb. 6.4). Für Rauschen bis $\sigma = 0,3$ rad ergeben alle drei Algorithmen eine mittlere Abweichung in der Größenordnung von 10^{-5} rad, welche bis $\sigma = 0,6$ rad auf eine Größenordnung von 10^{-2} rad ansteigt. Übertragen auf einen experimentellen Fall mit Illumination von $\lambda = 633$ nm und Brechungsindices ähnlich zu Wasser ($n = 1,33$) entspricht dies einer mittleren Abweichung der optischen Weglänge von weniger als 1 nm. Diese Ergebnisse sind folglich als sehr gut zu beurteilen. Die Abweichungen in den simulierten Datensätzen sind darin begründet, dass ein korrektes Phase Unwrapping ohne Zusatzannahmen nicht allgemein möglich ist, da die verrauschten Phasenverteilungen die Itoh-Bedingung verletzen. Ab einem Rauschniveau von $\sigma = 0,7$ rad zeigt die mittlere Abweichung des pixelbasierten SRNCP Algorithmus einen drastischen Anstieg auf bis auf 7,5 rad für $\sigma = 1,0$ rad. Die mittleren Abweichungen für beide kachelbasierten Algorithmen steigen deutlich langsamer auf maximal 0,49 rad an. Weder der pixelbasierte Algorithmus noch die kachelbasierten Algorithmen können die zugrundeliegende Phasenverteilung ohne Zusatzannahmen perfekt reproduzieren. Die kachelbasierten Algorithmen zeigen jedoch eine deutlich erhöhte Robustheit gegenüber dem gehäuften Auftreten von Residuen durch Verletzung der Itoh-Bedingung.

Analyse der Merger für fehlerhaft entfaltete Kacheln

In einer zweiten Testreihe wurde der Einfluss des Merging Algorithmus für den Fall eines Versagens des vorgeschalteten Kachel-Unwrappers untersucht. Dazu wurde der BLS Kachel-Unwrapper mit einer Aufteilung in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln angewandt. In diesem Fall enthielten einige Kacheln mehr als einen Phasensprung, sodass die Voraussetzung für einen erfolgreichen Phase Unwrap nicht mehr gegeben war. Auch nach Anwendung des BLS Kachel-Unwrappers enthielten diese Kacheln noch mindestens einen Phasensprung. Für das Zusammenfügen wurden je einmal der BLS Merger sowie der in dieser Arbeit entwickelte τ SRNCP Merger eingesetzt. Daraufhin wurden wie zuvor die mittleren Abweichungen in Abhängigkeit von dem Rauschniveau σ bestimmt (siehe Abb. 6.3 B auf Seite 79). Bis zu einem Rauschniveau von $\sigma = 0,5$ rad produziert der τ SRNCP Merger eine um mindestens 0,5 rad geringere mittlere Abweichung bezüglich der originalen Phase als der BLS Merger. Ursächlich dafür ist die Eigenschaft des BLS Mergers, fehlerhafte Entfaltungen auf nachfolgende Kacheln zu propagieren (siehe Abb. 6.5). Der τ SRNCP Merger zeigt dieses Verhalten nicht. Er ist demnach robuster gegenüber einem Versagen des Kachel-Unwrappers für diese Rauschniveaus. Für höhere Rauschniveaus gleichen sich die mittleren Abweichungen an und auch der τ SRNCP Merger pflanzt Fehler zu benachbarten Kacheln fort.

6.2.3 Anwendung auf synthetische Phasenverteilung mit Rauschen und abgeflachten Phasensprüngen

Generation von abgeflachten Phasensprüngen

Die im vorangegangenen Abschnitt generierten Residuen zeigen nicht das charakteristische Verhalten von unterbrochenen Sprunglinien wie in Abbildung 4.4. Um eine solche Phasenverteilung mit zusätzlichem Rauschen künstlich zu generieren, wurde wie folgt vorgegangen: zuerst wurde eine entfaltete Phase ϕ_u ohne Rauschen generiert, wie zuvor beschrieben. Daraus wurde eine umgebrochene Phasenverteilung erzeugt. Mit ImageJ wurde nun über einen

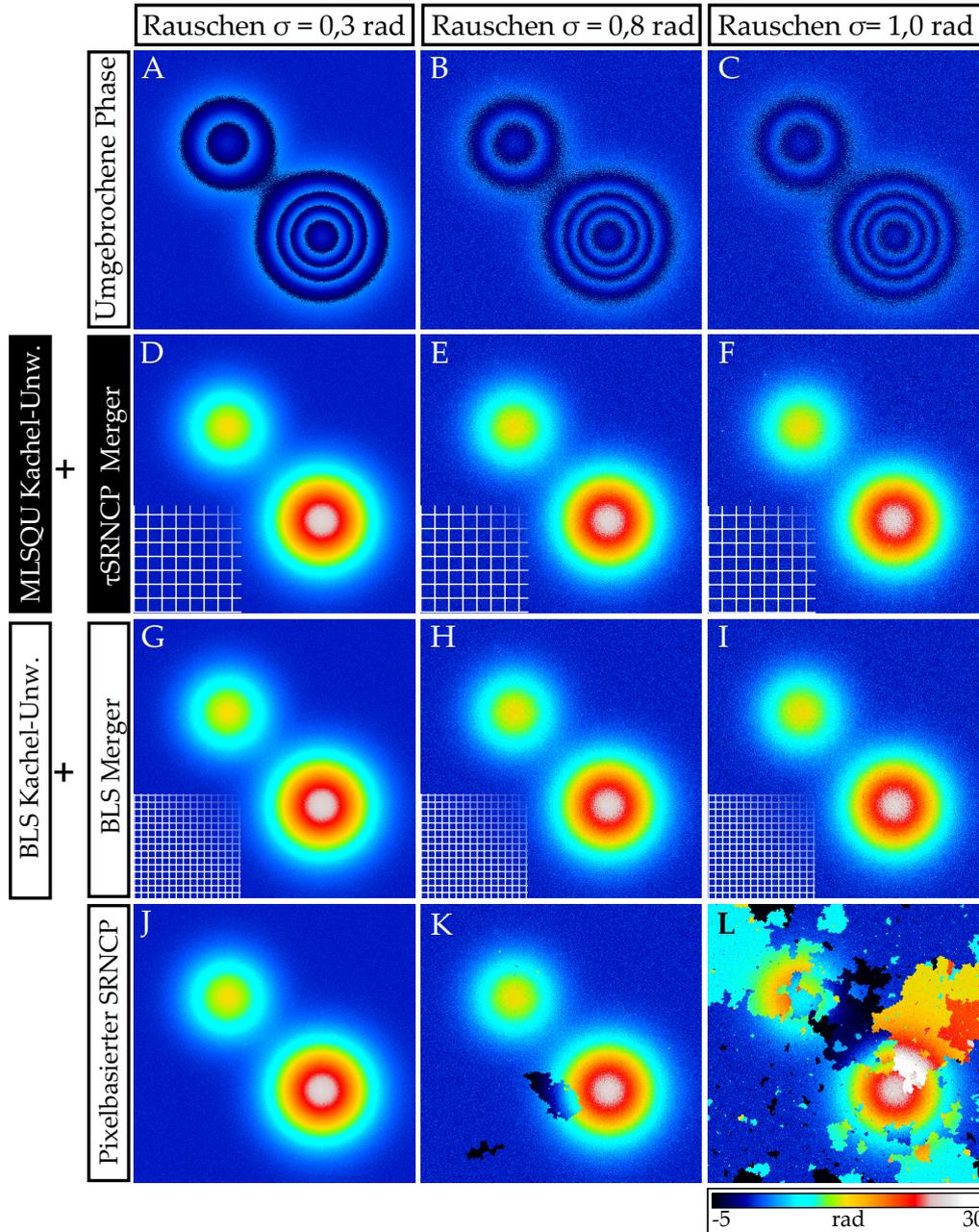


Abbildung 6.4: Entfaltung einer verrauschten synthetischen Phasenverteilung durch verschiedene Phase Unwrapping Algorithmen (nach [7]). **A,B,C** Umgebrochene Phasenverteilung mit einem additiven weißen gaußschen Rauschen mit Standardabweichung σ . **D,E,F** Ergebnis des kachelbasierten Phase Unwrappings bei Aufteilung in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln mit dem MLSQU Kachel-Unwrapper ($P = 2$, $N_\rho = 40$) und dem τ SRNCP Merger. Das Kachelraster ist am linken unteren Bildrand angedeutet. **G,H,I** Kachelbasiertes Phase Unwrapping mit dem BLS Kachel Unwrapper ($N_\rho = 40$) und BLS Merger bei Aufteilung in $N_\tau = 40 \times 40$ Kacheln. **J,K,L** Ergebnis des pixelbasierten SRNCP Algorithmus. Fortsetzung dieser Grafik in Abbildung 6.5. In dieser Arbeit entwickelte Algorithmen sind in schwarzen Boxen dargestellt.

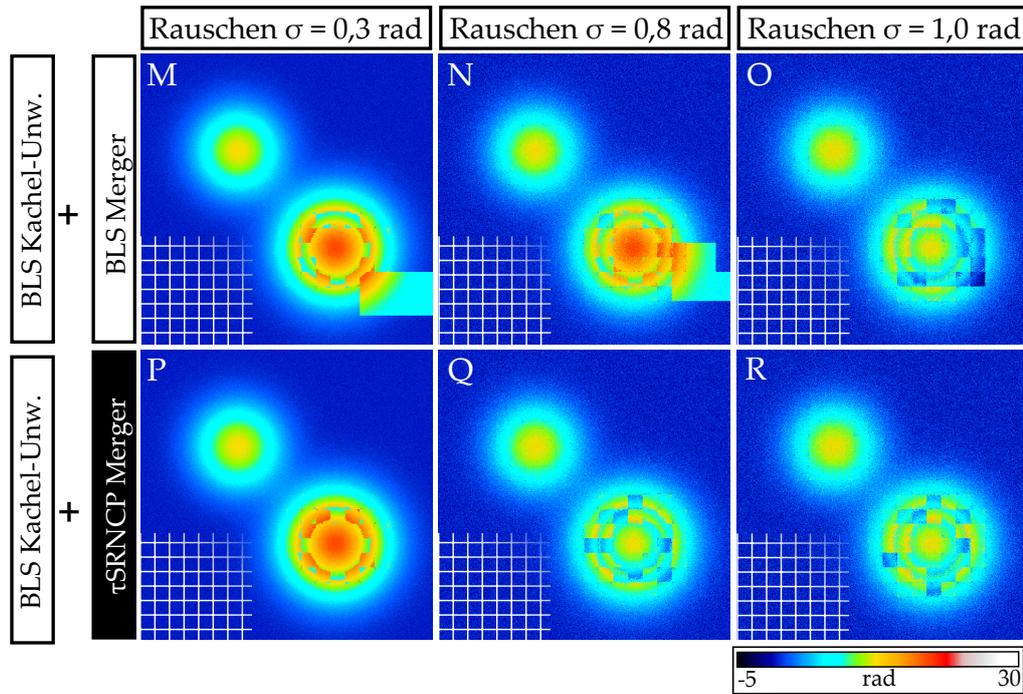


Abbildung 6.5: Entfaltung einer verrauschten synthetischen Phasenverteilung durch verschiedene Phase Unwrapping Algorithmen (Fortsetzung von Abb. 6.4). In beiden Fällen wird der BLS Kachel-Unwrapper ($N_\rho = 20$) für eine Unterteilung in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln eingesetzt. Einige Kacheln können nicht erfolgreich entfaltet werden, weil sie mehr als einen 2π -Phasensprung enthalten (vgl. Abschnitt 4.2.5.2). Der Einfluss des Merging Algorithmus wurde analysiert: **M,N,O** BLS Merger. **P,Q,R** τ SRNCP Merger. In dieser Arbeit entwickelte Algorithmen sind in schwarzen Boxen dargestellt.

Teil einer Sprunglinie ein Rechteck platziert und ein gaußscher Weichzeichner mit einem Radius von 5 Pixeln angewandt. Dies simulierte den Effekt einer unterbrochenen Sprunglinie, da der Phasensprung im Bereich des Rechtecks zu einem kontinuierlichen Übergang abgeflacht wurde. Zum Abschluss wurde auf die Phasenverteilung ein weißes gaußsches Rauschen mit einer Standardabweichung von $\sigma = 0,3$ rad addiert und die Phase wiederum umgebrochen. Diese Phasenverteilung wird mit verschiedenen Phase Unwrapping Algorithmen entfaltet und die Ergebnisse werden qualitativ verglichen. Die Ergebnisse der Algorithmen sind in Abb. 6.6 dargestellt.

Ergebnisse der Phase Unwrapping Algorithmen

Der pixelbasierte SRNCP Algorithmus (siehe Abb. 6.6 B) und der BLS Algorithmus von Strand *et al.* (siehe Abb. 6.6 C) propagieren fehlerhafte Entfaltungen, ausgehend von der abgeflachten Sprunglinie auf weite Bereiche der entfalteten Phasenverteilung. Dabei sind beim pixelbasierten SRNCP etwa ein Drittel und beim BLS Algorithmus ein Viertel der entfalteten Phase betroffen. Dies ist eine direkte Folge der Residuen durch die abgeflachte Sprunglinie.

Um zunächst die Eigenschaften des in dieser Arbeit entwickelten MLSQU Kachel-Unwrappers zu untersuchen, wurde die Phasenverteilung zunächst in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln unterteilt. Für das modellbasierte Unwrapping jeder Kachel wurde die Polynomordnung $P = 2$ verwendet. Als Merger wurden ein-

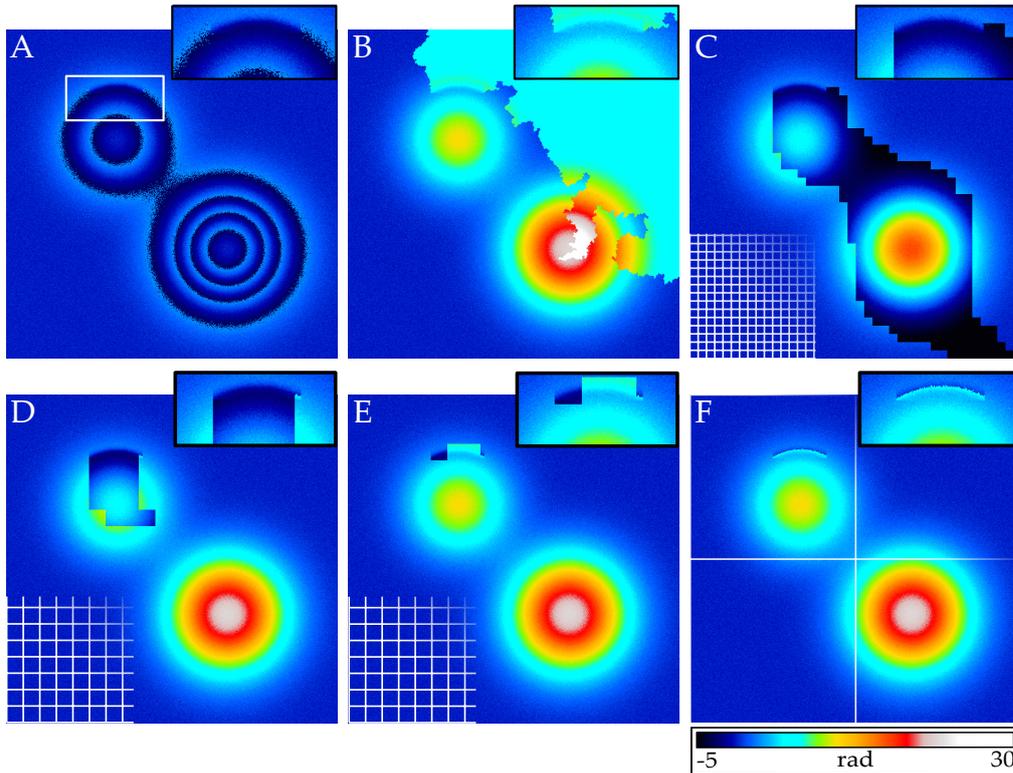


Abbildung 6.6: Ergebnisse verschiedener Algorithmen für die Entfaltung einer synthetischen verrauschten Phasenverteilung mit künstlich abgeflachter Sprunglinien (nach [7]). **A** Die umgebrochene Phasenverteilung enthält ein additives weißes gaußsches Rauschen mit $\sigma = 0.3$ rad. Eine Sprunglinie ist durch Anwendung eines Weichzeichners abgeflacht. Der Bereich um diese abgeflachte Sprunglinie ist vergrößert dargestellt. **B** Ergebnis des pixelbasierten SRNCP Algorithmus. **C** Ergebnis des kachelbasierten BLS Algorithmus ($N_\rho = 20$) mit Aufteilung $N_\tau = 40 \times 40$. **D** Ergebnis des kachelbasierten Algorithmus mit MLSQU Kachel-Unwrapper ($P = 2$, $N_\rho = 40$) und BLS Merger bei Aufteilung $N_\tau = 20 \times 20$. **E** Wie D, jedoch mit τ SRNCP Merger. **F** Wie E, jedoch mit Aufteilung in $N_\tau = 2 \times 2$ Kacheln und Polynomordnung $P = 6$ und $N_\rho = 60$. Alle Bilder haben die Dimension von 600×600 Pixeln.

mal der BLS Merger sowie der τ SRNCP Merger verwendet. In der Kombination von MLSQU Kachel-Unwrapper und BLS Merger zeigt die entfaltete Phase eine Propagation von fehlerhaft entfaltenen Kacheln auf einen begrenzten Bereich von ca. 4% der Gesamtfläche (siehe Abb. 6.6 D). Dies ist eine deutliche Senkung der betroffenen Fläche gegenüber dem Ergebnis des BLS Algorithmus. Die Aufteilung der Phasenverteilung in $N_\tau = 20 \times 20$ Kacheln ist erst durch den neu entwickelten MLSQU Kachel-Unwrapper möglich und kann mit dem BLS Kachel-Unwrapper nicht erfolgreich durchgeführt werden. Wird der in dieser Arbeit entwickelte τ SRNCP Merger statt des BLS Mergers verwendet, findet keine Propagation der fehlerhaften Entfaltung statt. Der Einfluss ist lediglich auf die 4 Kacheln beschränkt, in welchen sich die abgeflachte Sprunglinie befindet (siehe Abb. 6.6 E).

Für einen abschließenden Test des MLSQU Kachel-Unwrappers wurde die Phasenverteilung in $N_\tau = 2 \times 2$ Kacheln mit jeweils 300×300 Pixeln unterteilt.

Die Polynomordnung für die verwendete Modellfunktion wird als $P = 6$ festgelegt. Durch die Wahl der Kacheldimensionen liegt die abgeflachte Sprunglinie vollständig im Inneren der linken oberen Kachel. Nach der Entfaltung der Kachel zeigt sich ein Effekt des Residuums nur in Pixeln nahe der abgeflachten Sprunglinie (siehe Abb. 6.6 F). Insbesondere wurden fehlerhafte Entfaltungen nicht zum Rand dieser Kachel propagiert, sodass die anderen Kacheln im Merging Schritt eindeutig zusammengefügt werden konnten. Der Einfluss des Residuums durch die abgeflachte Sprunglinie wurde in diesem Fall minimiert.

6.2.4 Anwendung auf Messdaten aus der digitalen Holographie

Für einen Test an realen Messdaten wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Unwrapping Algorithmen auf einen Datensatz aus der digitalen Holographie angewandt, siehe Abb. 6.7. Dieses sind Messdaten von trypsinisierten caninen ZMTH₃ Zellen. Die digital holographische Aufnahme wurde mit dem in Abschnitt 5.1 beschriebenen Aufbau aufgenommen und auf einen Ausschnitt von 1400×1400 Pixeln beschränkt. Zur besseren Darstellbarkeit wurde der Hintergrund in Form eines Polynoms zweiter Ordnung von der umgebrochenen Phase entfernt. In der umgebrochenen Phasenverteilung sind Residuen durch abgeflachte Sprunglinien vorhanden (siehe Abb. 6.7 A).

Basierend auf den Ergebnissen der vorigen Untersuchungen wurden der kachelbasierte MLSQU Kachel-Unwrapper mit dem τ SRNCP Merger kombiniert und mit dem pixelbasierten SRNCP Algorithmus verglichen. Für den kachelbasierten Algorithmus wurde die Phasenverteilung in $N_\tau = 8 \times 8$ Kacheln aufgeteilt und die Entfaltung der Kacheln mit der Polynomordnung $P = 4$ durchgeführt. Die Ergebnisse beider Algorithmen für die entfaltete Phase sind identisch bis auf wenige Unterabschnitte. In diesen Regionen führen Residuen durch abgeflachte Phasensprünge beim pixelbasierten SRNCP zu fehlerhafter Entfaltung (siehe Abb. 6.7 B). Bei dem kachelbasierten Algorithmus werden die Fehler nicht in angrenzende Bildregionen fortgepflanzt, sondern sind beschränkt auf die direkte Nachbarschaft der abgeflachten Phasensprünge (siehe Abb. 6.7 C). Diese Ergebnisse sind konsistent mit dem zuvor beschriebenen Verhalten der Phase Unwrapping Algorithmen an synthetischen verrauschten Phasenverteilungen mit abgeflachten Phasensprüngen. Auch dort zeigten die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Algorithmen überlegene Resultate.

6.2.5 Laufzeit und Komplexität

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse bezüglich der asymptotischen Laufzeitklassen der kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen dargestellt. Eine ausführliche Analyse der Laufzeitklassen verschiedener Phase Unwrapping Algorithmen wurde in der bereits erwähnten Bachelorarbeit durchgeführt [177]. Exemplarisch sind die Laufzeiten der Algorithmen für die Daten aus den Abschnitten 6.2.2 und 6.2.3 in Tabelle 6.1 gegeben.

Die Betrachtungen zur Laufzeit legen eine umgebrochenen Phasenverteilung konstanter Größe auf einem quadratischen Raster von $N_{px} = N_x \times N_y$ Pixeln zugrunde. Die Aufteilung erfolge in $N_\tau = N_{\tau x} \times N_{\tau y}$ quadratische Ka-

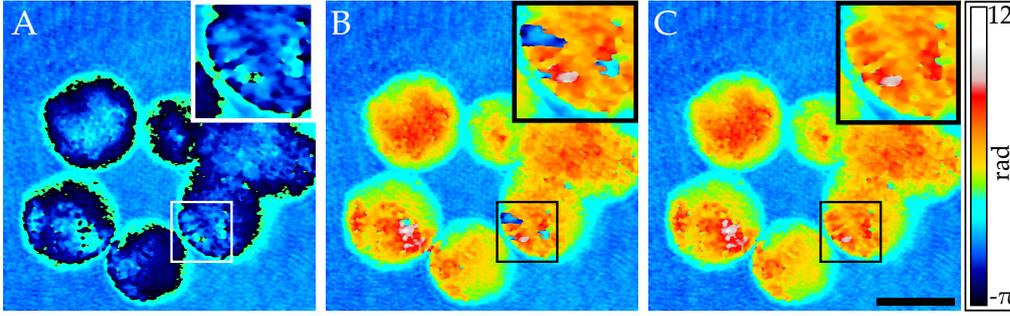


Abbildung 6.7: Phase Unwrapping von Messdaten aus der digitalen Holographie (nach [7]). Dargestellt sind trypsinisierte ZMTH₃ Zellen in Suspension in einem Kulturmedium. **A** Umgebrochene Phasenverteilung. **B** Ergebnis des pixelbasierten SRNCP Algorithmus. Hier treten in Unterabschnitten des Bildes (siehe Vergrößerung) fehlerhafte Bereiche auf, die durch Propagation von fehlerhaften Entfaltungen an abgeflachten Phasensprüngen bedingt sind. **C** Ergebnis der Kombination der in dieser Arbeit entwickelten kachelbasierten Algorithmen: MLSQU Kachel-Unwrapper mit $P = 4$, $N_\rho = 40$ und τ_{SRNCP} Merger. Die Phasenverteilung wird dazu in $N_\tau = 8 \times 8$ Kacheln unterteilt. Die zuvor beobachteten fehlerhaften Regionen verschwinden. Skalenbalken $15 \mu\text{m}$.

cheln gleicher Dimension. Für die Kachel-Unwrapper wurde die kumulative Laufzeit zur Entfaltung aller Kacheln gemessen und für die Merger die kumulative Laufzeit des Zusammenfügens aller Kacheln. Dabei wird eine sequentielle Ausführung zugrunde gelegt, d.h. insbesondere keine Parallelisierung des Kachel-Unwrapping Schrittes.

Die Laufzeit $T_{\text{BLS}}^{\text{Unwr}}$ des BLS Kachel-Unwrappers hängt nicht von der Anzahl der Kacheln ab, sondern nur von der Dimension des Bildes und der Anzahl an Schritten N_ρ zur Minimierung der Phasensprünge:

$$T_{\text{BLS}}^{\text{Unwr}} = \mathcal{O}(N_{\text{px}} \cdot N_\rho).$$

Bei der Entfaltung eines Kachelrasters mit dem BLS Kachel-Unwrapper werden unabhängig von der Geometrie der Kacheln die gleiche Anzahl an Operationen pro Pixel der Phasenverteilung durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.5.2). Auch für den MLSQU Algorithmus ist die Anzahl an Operationen pro Pixel für einen gegebenen Satz von Basisfunktion und Minimierungsschritten N_ρ konstant, falls die Gradientenmatrix vorab bekannt ist. Die Laufzeit $T_{\text{MLSQU}}^{\text{Unw}}$ des MLSQU Algorithmus für eine Menge an Kacheln hängt demnach neben N_ρ auch von der Anzahl an Basisfunktionen N_B ab:

$$T_{\text{MLSQU}}^{\text{Unwr}} = \mathcal{O}(N_{\text{px}} \cdot (N_\rho + N_B))$$

Die Anzahl der Basisfunktionen N_B geht dabei linear ein, da sie die Anzahl an Spalten der Gradientenmatrix vorgibt. Die benötigten Rechenoperationen pro Pixel wachsen linear mit der Anzahl der Spalten dieser Matrix. Für eine polynomielle Modellfunktion nach Gleichung 6.4 gilt $N_B = P^2 - 2P$. Die Gradientenmatrix sowie ihre Singulärwertzerlegung müssen für ein gegebenes Kachelmuster und eine Menge von Basisfunktionen zusätzlich einmal berechnet werden.

Kacheln	Algorithmus	Laufzeit
40 × 40	BLS Kachel-Unwrapper ($N_\rho = 40$)	453,0 ms
	BLS Kachel-Merger	3,0 ms
20 × 20	BLS Kachel-Unwrapper ($N_\rho = 20$)	236,4 ms
	BLS Kachel-Merger	1,0 ms
20 × 20	BLS Kachel-Unwrapper ($N_\rho = 20$)	235,0 ms
	τ SRNCP Kachel-Merger	3,4ms
20 × 20	MLSQU Kachel-Unwrapper ($N_\rho = 40, P = 2$)	578,8 ms (+1,6 ms)
	τ SRNCP Kachel-Merger	4,0 ms
2 × 2	MLSQU Kachel-Unwrapper ($N_\rho = 60, P = 6$)	1342 ms (+1533 ms)
	τ SRNCP Kachel-Merger	< 1,0 ms
–	Pixelbasierter SRNCP Algorithmus	155,4 ms

Tabelle 6.1: Laufzeiten der im Abschnitt verwendeten Phase Unwrapping Algorithmen für eine Phasenverteilung von 600×600 Pixeln. Für die kachelbasierten Algorithmen sind die Laufzeiten von Kachel-Unwrapper und Kachel-Merger getrennt angegeben. Diese sind unabhängig voneinander und summieren sich zur Gesamtlaufzeit des Algorithmus. Für den MLSQU Kachel-Unwrapper ist die Laufzeit für eine Entfaltung bei bekannter Gradientenmatrix angegeben. Die zusätzliche Laufzeit zur Berechnung der Gradientenmatrix steht in Klammern. Die Laufzeiten sind Mittelwerte von fünf unabhängigen Zeitmessungen auf einem Arbeitsplatzrechner mit einer intel[®] i5-4570 3.2 GHz CPU und 32 GB Arbeitsspeicher. Alle Berechnungen wurden auf einem einzelnen Prozessorkern sequentiell durchgeführt.

Die Merger Algorithmen BLS und τ SRNCP übernehmen keine Parameter zusätzlich zur gekachelten Phasenverteilung. Infolgedessen hängen die Laufzeiten nur von der Anzahl N_{px} der Bildpunkte der Phasenverteilung und der Anzahl N_τ der Kacheln ab. Für die Laufzeit T_{BLS}^{Merge} des BLS Mergers ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von der Anzahl der Kacheln, da jede Kachel entlang eines linearen Pfades genau einmal durchlaufen wird. Weiterhin werden die Mittelwerte aller Kantendifferenzen mit einer Komplexität von insgesamt $\mathcal{O}((N_\tau \cdot N_{px})^{\frac{1}{2}})$ berechnet [177].

$$T_{BLS}^{Merge} = \mathcal{O}(N_\tau + (N_\tau \cdot N_{px})^{\frac{1}{2}}).$$

Für den hier entwickelten τ SRNCP Merger wird die Varianz der Kantendifferenzen berechnet und dann die Kanten entsprechend des Qualitätskriteriums sortiert und zusammengefügt. Die Laufzeitklasse ergibt sich als [177]:

$$T_{\tau SRNCP}^{Merge} = \mathcal{O}(N_\tau^2 + (N_\tau \cdot N_{px})^{\frac{1}{2}}).$$

Die Berechnung der Varianz der Kantendifferenzen ist aufwändiger als die Berechnung des Mittelwertes beim BLS Merger. Die asymptotische Komplexität des Rechenaufwands ist jedoch gleich. Das sortierte Zusammenfügen der Kacheln wächst mit dem Quadrat der Anzahl Kacheln. Die theoretisch berechneten Laufzeitklassen konnten durch Experimente zur Laufzeit bestätigt

werden. Abweichungen vom asymptotischen Verhalten sind durch einen Laufzeit-Overhead durch die objektorientierte Implementation des modularen C++ Frameworks zu erklären [177].

6.3 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES KAPITELS

In diesem Kapitel wurden Algorithmen zum kachelbasierten, zweidimensionalen Phase Unwrapping entworfen, analysiert und mit bestehenden Phase Unwrapping Algorithmen verglichen. Der hier entwickelte MLSQU Kachel-Unwrapper entfaltet einzelne Kacheln durch Anpassung einer Modellfunktion mittels linearer Algebra. Als Modellfunktion wurde ein zweidimensionales Polynom angesetzt. Zum Zusammenfügen von entfaltetem Kacheln wurde der τ SRNCP Merger kreiert, basierend auf dem Prinzip des pixelbasierten SRNCP Algorithmus. Dafür wurde ein Qualitätsmaß für Kanten zwischen zwei Kacheln auf Basis der Varianz der Kantendifferenz entwickelt. Die Implementation der Phase Unwrapping Algorithmen erfolgte in einem eigens dafür entwickelten C++ Programm mit einem modularen Konzept. Durch einen hohen Abstraktionsgrad wurden Schnittstellen für das kachelbasierte Phase Unwrapping geschaffen, die nach dem Baukastensystem kombinierbar und beliebig erweiterbar sind. Dieses Programm wurde als freie, quelloffene Software veröffentlicht. Die hier entwickelten Algorithmen wurden mit dem kachelbasierten BLS Algorithmus von Strand *et al.*, bestehend aus BLS Kachel-Unwrapper und BLS Merger, und dem pixelbasierten SRNCP Algorithmus von Harráez *et al.* verglichen.

Die Anpassung der Modellfunktion beim MLSQU Kachel-Unwrapper führt zu einem zusätzlichen Rechenaufwand gegenüber dem BLS, der quadratisch mit dem Grad der polynomiellen Modellfunktion steigt. Für eine feste Bildgröße ist die Laufzeit sowohl des BLS als auch des MLSQU Kachel-Unwrappers unabhängig von der Anzahl der Kacheln. Für einen Polynomgrad von 4 ist die Laufzeit des MLSQU Algorithmus etwa doppelt so hoch wie für den BLS Kachel-Unwrapper. In diesem Fall kann der hier entwickelte MLSQU Kachel-Unwrapper etwa doppelt so große Kacheln erfolgreich entfalten wie der BLS Kachel-Unwrapper.

Anhand von synthetischen Phasenverteilungen wurde nachgewiesen, dass die kachelbasierten Algorithmen eine deutlich erhöhte Robustheit gegenüber dem Auftreten von Rauschen und Residuen zeigen als der pixelbasierte Algorithmus. Beim pixelbasierten Algorithmus werden Fehler auf weite Bildbereiche propagiert, während diese bei den kachelbasierten Algorithmen lokal beschränkt bleiben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die hier entwickelten kachelbasierten Algorithmen sowohl im Vergleich mit dem BLS als auch dem SRNCP Algorithmus überlegene Ergebnisse liefern. Ein Grund dafür ist die Fähigkeit des hier entwickelten MLSQU Algorithmus, größere Kacheln als der BLS Algorithmus zu entfalten und so die Effekte von Residuen auf weniger Kacheln zu beschränken. Zusätzlich ist der in dieser Arbeit entwickelte τ SRNCP Merger unempfindlicher gegen die Effekte von Residuen als der BLS Merger, da diese beim Zusammenfügen der Kacheln isoliert werden. Diese Ergebnisse wurden an Messdaten aus der digitalen Holographie erfolgreich validiert.

IN DIESEM Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert und ein Ausblick auf nachfolgende Arbeiten gegeben. Die Resultate werden zunächst kapitelweise in Bezug zu den in Abschnitt 1.2 definierten Zielen diskutiert. Begonnen wird in Abschnitt 7.1 mit den Ergebnissen zur Analyse und Korrektur von Rekonstruktionsartefakten durch Lichtbrechung in SLOT aus Kapitel 3. Anschließend erfolgt in Abschnitt 7.2 eine Diskussion der Ergebnisse zu der Untersuchung der GNP-vermittelten Laserperforation mit kombinierter Fluoreszenz- und digital holographischer Bildgebung aus Kapitel 5. Daraufhin werden in Abschnitt 7.3 die Ergebnisse aus Kapitel 6 bezüglich der Entwicklung und der Evaluation von neuen Phase Unwrapping Algorithmen diskutiert. Das Kapitel beendet die Arbeit mit einem Fazit.

7.1 KORREKTUR VON ARTEFAKTEN DURCH LICHTBRECHUNG IN SLOT

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der Lichtbrechung untersucht, die durch die Halterung von Proben innerhalb einer Glaskapillare verursacht wird. Auf Basis der dort gewonnenen Erkenntnisse wurde die Sinogramm-Entzerrung entwickelt, welche die artefaktfreie Rekonstruktion von derart gehalterten Proben in SLOT ermöglicht.

Durch eine detaillierte Untersuchung anhand von theoretischen Berechnungen und numerischen Simulationen wurde ein Verständnis für die Ursachen und die Effekte der Lichtbrechung aufgrund einer Glaskapillare in SLOT entwickelt. Es wurde gezeigt, dass sich Artefakte in den rekonstruierten Daten durch einen Winkelversatz aufgrund der Brechung der rasternden Nadelstrahlen an den Grenzflächen der Kapillare ergeben. Diese Artefakte verhindern eine quantitative Auswertung der volumetrischen Datensätze. Die Gestalt der Artefakte wurde in numerischen Simulationen in Abhängigkeit von dem verwendeten Badfluid quantifiziert. Auch der Einfluss des Radon-Inversions Algorithmus selbst auf die Entstehung von Artefakten wurde untersucht. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Sinogramm-Entzerrung entwickelt. Diese entfernt die Effekte der Lichtbrechung vor der Rekonstruktion aus den gemessenen Projektionsdaten und überführt sie so in echte Sinogramme. Diese können mit herkömmlichen Radon-Inversions Algorithmen artefaktfrei rekonstruiert werden. Dadurch wird eine Auswertung der volumetrischen Datensätze möglich. Die Sinogramm-Entzerrung kann leicht in die bestehende Prozesskette zur Datenverarbeitung vor der Rekonstruktion integriert werden. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 7.1 schematisch dargestellt. Im Folgenden wird die Bedeutung der Sinogramm-Entzerrung für SLOT diskutiert und die vorgestellte Methode mit anderen Lösungsansätzen verglichen.

Ein anderer Ansatz zur Korrektur von Artefakten durch Lichtbrechung aufgrund einer Glaskapillare wurde für die OPT von Birk *et al.* vorgestellt [17]. Dort wurde der FBP Algorithmus modifiziert, um die Winkelverschiebung

Prinzip und Einordnung in die Datenverarbeitung

Vergleich mit anderen Lösungsansätzen

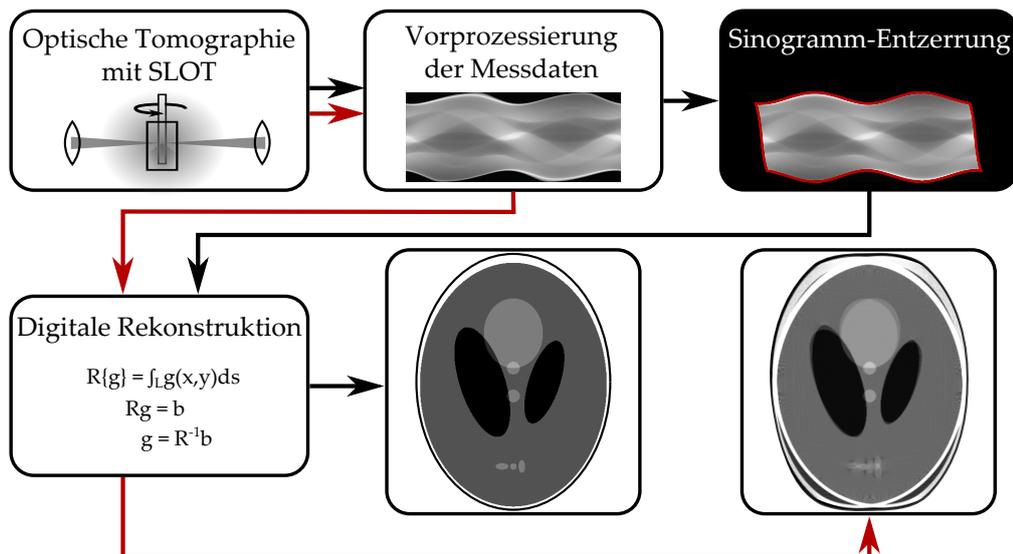


Abbildung 7.1: Einordnung der Sinogramm-Entzerrung in die Prozesskette der digitalen Datenverarbeitung bei SLOT. Nach der Messung findet standardmäßig eine Vorprozessierung der gemessenen Projektionsdaten statt, beispielsweise um Bildfehler durch fehlerhafte Kalibration der Scanner zu beseitigen. Danach werden die Daten mit einem Rekonstruktionsalgorithmus verarbeitet. In Gegenwart von Lichtbrechung ergeben sich Bildartefakte nach der Rekonstruktion. Dieser Arbeitsablauf ist durch rote Pfeile markiert. Die Sinogramm-Entzerrung findet vor der Rekonstruktion der Messdaten statt und verhindert die Entstehung von Bildartefakten in den rekonstruierten Daten (schwarze Pfeile). Dieser Algorithmus wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und ist in einer schwarzen Box dargestellt.

während der Rückprojektion zu kompensieren. In jener Studie wurde eine Variation des Badfluids allerdings nicht untersucht und weiterhin eine Brechungsindexanpassung des Bades an die Kapillare ($n_{\text{bad}} = n_{\text{kap}}$) vorausgesetzt. Allerdings sind die in SLOT und OPT generierten Datensätze im Hinblick auf die Rekonstruktion äquivalent. Der modifizierte FBP Algorithmus könnte demnach auch für SLOT verwendet werden. Obwohl dieser Ansatz der Sinogramm-Entzerrung prinzipiell ähnlich ist, existiert ein wichtiger konzeptioneller Unterschied: Das von Birk *et al.* beschriebene Verfahren lässt nur die Rekonstruktion mittels FBP Algorithmus zu. Hingegen ist die in dieser Arbeit entwickelte Sinogramm-Entzerrung eine Erweiterung der digitalen Rekonstruktion, die *vor* der inversen Radon-Transformation der Projektionsdaten ansetzt. Sie hat dadurch den Vorteil, dass sie die freie Auswahl eines Algorithmus zur numerischen Inversion der Radon-Transformation erlaubt. Diverse Algorithmen sind als freie Software erhältlich und können so auf einfache Weise in die Prozesskette integriert werden [120, 168]. Darüber hinaus wurde für SLOT von Lorbeer und Lorbeer beispielsweise ein spezieller Algorithmus zur Reduktion von Streifenartefakten entwickelt [125, 127]. Auch dieser ist mit der Sinogramm-Entzerrung kombinierbar. Die Sinogramm-Entzerrung vor der Rekonstruktion ermöglicht also eine hohe Modularität in der digitalen Datenverarbeitung bei SLOT. Für geeignete Messdaten kann durch die Auswahl

eines abgestimmten Rekonstruktionsalgorithmus die Qualität des volumetrischen Datensatzes gesteigert werden [26, 144, 187].

Um die Bedeutung der Sinogramm-Entzerrung für die *in vitro* Bildgebung mit SLOT zu erörtern, müssen zuerst biologische Proben identifiziert werden, für die eine Halterung in einer Glaskapillare vorteilhaft ist. In dieser Arbeit wurden Zellaggregate aus humanen Stammzellen als Proben verwendet. Die Glaskapillare bietet dabei eine Möglichkeit, die Zellen in einem abgeschlossenen System vital zu erhalten [18, 142]. Auf eine Heizung wurde in dieser Arbeit verzichtet, sie kann jedoch auf einfache Weise durch Beheizung des Bades integriert werden. Auch andere biologische Modellorganismen, wie der Zebrafisch oder der *C. elegans*, wurden zur *in vitro* Bildgebung mit OPT bereits in einer Glaskapillare gehaltert [17]. Die Kapillare ermöglicht einerseits eine einfache Halterung der Probe an der Rotationsachse und trägt darüber hinaus durch ihre starre Innenwand zur Immobilisierung der Probe bei [142, 158]. Demnach kann sowohl bei diesen Organismen als auch bei den Zellaggregaten ein geringer Abstand zur Innenwand oft nur schwerlich vermieden werden. Ohne Korrektur würden Bildartefakte nach der Rekonstruktion auftreten, die eine quantitative Analyse der rekonstruierten volumetrischen Daten verhindern. Für geeignete Proben kann unter Umständen eine Platzierung in der Mitte eines ausreichend großen Glaszylinders erfolgen, sodass dort die Lichtbrechung als Ursache für Artefakte nicht berücksichtigt werden muss [83]. Ist dies aus praktischen Gründen nicht durchführbar, ermöglicht die Sinogramm-Entzerrung dennoch die *in vitro* Bildgebung in SLOT.

Einen alternativen Entwurf zum Einsatz einer Glaskapillare für die *in vitro* Bildgebung von biologischen Proben stellt eine Inkubationsprobenkammer dar. Dort kann auf die Glaskapillare verzichtet werden, wenn die gesamte Proben- und Rotationseinheit steril gekapselt wird. Es existiert schon seit langem ein Konzept für eine Inkubationsprobenkammer in SLOT, jedoch ist eine Umsetzung während der Laufzeit dieser Arbeit nicht erfolgt [82]. Dies liegt nicht zuletzt an den hohen Anforderungen von SLOT an die mechanische Stabilität der Rotationsachse. Konzeptionell ist eine Inkubationsprobenkammer jedoch eine gute Möglichkeit für die *in vitro* Bildgebung in SLOT. Ein Vorteil gegenüber der Halterung in der Glaskapillare ist, dass dort eine Begasung der Probe leicht integriert werden kann. In einer Kapillare muss ein gepuffertes Medium (z.B. durch Zusatz von HEPES) verwendet werden und begrenzt die Gesamtdauer, über die die biologischen Organismen am Leben erhalten werden können. Der wesentliche Nachteil der Inkubationskammer ist, dass die sterile Überführung von Proben in die Kammer mit einem erheblichen experimentellen Aufwand verbunden ist. Hingegen ist die Überführung von Proben in die Kapillare und die anschließende Versiegelung sehr einfach an einer Sterilbank möglich. Für Messungen kann dann ein regulärer SLOT Aufbau mit beheizter Küvette verwendet werden. So kann mit Hilfe der Sinogramm-Entzerrung also besonders für Fragestellungen mit einer großen Probenzahl ein Zeitvorteil bei der Messung erreicht werden.

In Abschnitt 3.4 wurde die Anwendung der Sinogramm-Entzerrung zur artefaktfreien Rekonstruktion von dreidimensionalen tomographischen Daten erfolgreich demonstriert. Das Vorgehen lässt sich allerdings nicht ohne Weiteres auf beliebige Brechungsindexverteilungen übertragen. Grund dafür ist, dass

*Bedeutung für die in vitro
Bildgebung mit SLOT*

*Vergleich mit einer
Inkubationsprobenkammer*

*Erweiterung auf beliebige
Geometrien*

eine Vereinfachung ausgenutzt werden konnte, indem die Ausrichtung der Kapillare senkrecht zur optischen Achse erfolgte. Damit ließ sich die Lichtbrechung als zweidimensionales Problem in den Ebenen senkrecht zur Rotationsachse betrachten. Dies erlaubte die Anwendung der Sinogramm-Entzerrung in allen Ebenen einzeln. Zudem war es dadurch möglich, die zweidimensionale Radon-Inversion zur Rekonstruktion der Ebenen anzuwenden. Die zweidimensionale Radon-Transformation wird sowohl bei SLOT als auch bei der OPT standardmäßig verwendet, da sich eine Parallelprojektion stets in einzelne Ebenen zerlegen lässt [128, 171]. Für beliebig geformte refraktive Oberflächen ist dies in der Regel nicht mehr durchführbar. In diesem Fall ist es zweckdienlich, die dreidimensionale Form der Radon-Transformation anzusetzen, die durch die Koordinaten von Strahlen mit beliebiger Orientierung im Raum parametrisiert ist. Es ist dann möglich, die Sinogramm-Entzerrung als eine Neuordnung des Sinogramms in dreidimensionalen Koordinaten zu verallgemeinern. Falls sich Lücken in der Abtastung des dreidimensionalen Sinogramms durch die Form der Oberfläche ergeben, können iterative Algorithmen zur Rekonstruktion eingesetzt werden [130, 168]. Allerdings kann die Sinogramm-Entzerrung nur eingesetzt werden, wenn die Nadelstrahlen nach der Brechung geradlinig durch die zu messende Probe propagieren. Sollte dies nicht mehr gelten oder die Brechungsindexverteilung selbst unbekannt sein, so wird das Problem der Rekonstruktion sehr komplex und rechenaufwändig. In diesem Zusammenhang sollten Lösungsansätze aus der Ultraschall-Tomographie in die Technik von SLOT und die digitale Rekonstruktion integriert werden [27, 191].

Mit den zuvor diskutierten Ergebnissen sind die Ziele erreicht, *SLOT in Gegenwart von Lichtbrechung nutzbar zu machen* und *die Entwicklung von SLOT im Bereich der in vitro Bildgebung voranzutreiben*.

7.2 KOMBINIERTE HOLOGRAPHISCHE UND FLUORESCENZBILDGEBUNG

Mit einem eigens dafür entwickelten multimodalen Bildgebungs- und Perforationsaufbau wurde eine Studie zum Verhalten von caninen ZMTH₃ Zellen bei der Goldnanopartikel vermittelten Laserperforation durchgeführt. Durch die Kombination von digitaler Holographie und Fluoreszenzbildgebung ermöglichte der experimentelle Aufbau die Analyse der Reaktion von einzelnen Zellen auf die GNP-vermittelte Laserperforation.

Mit der multimodalen Bildgebung wurden die Vitalität und die Perforationseffizienz sowie der intrazelluläre Calciumspiegel nach der Bestrahlung gemessen. Zusätzlich wurde mit der digitalen Holographie das Verhalten des Phasenvolumens der Zellen quantifiziert. Die zeitliche Dynamik des Phasenvolumens in der ersten Minute nach Bestrahlung konnte mit einer Linearkombination aus exponentiellem Abfall und einem anschließenden linearen Verlauf modelliert werden. Ein anfängliches exponentielles Verhalten trat nur bei der höchsten verwendeten Fluenz bei allen Zellen auf, bei der mittleren Fluenz bei mehr als der Hälfte der Zellen und bei der niedrigsten Fluenz nur in Einzelfällen. Für niedrigste untersuchte Fluenz konnten keine signifikanten Effekte bezüglich des Calciumspiegels und des Phasenvolumens nachgewiesen werden, obwohl eine Perforationswahrscheinlichkeit von über 50 % gemessen

wurde. Für höhere Fluenzen wurde ein rasches Ansteigen des Calciumspiegels innerhalb von 2 bis 3 s gemessen, gefolgt von einem langsamen Absinken. Weiterhin konnte eine interzelluläre Calciumwelle über unbestrahlte Zellen hinweg beobachtet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse besitzen vielfältige Bedeutung für die GNP-vermittelte Laserperforation und -transfektion von Zellen. Die Dynamik des Zellvolumens ist relevant, weil eine Veränderung des Zellvolumens regulatorische Prozesse in Gang setzt, die auf komplexe Weise auch das Überleben einer Zelle beeinflussen [32, 88]. Eine anhaltende Deregulation des Zellvolumens kann Signalwege einleiten, die zum Zelltod führen [129]. Gleiches gilt für eine anhaltende Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels [34]. Die Beobachtung des Ca^{2+} -Signals der Zellen nach der GNP-vermittelte Laserperforation zeigt, dass sowohl zelluläre als auch zellübergreifende Signalwege ausgelöst werden können. Die in dieser Arbeit beobachteten Messgrößen können also einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität der Zellen nach der GNP-vermittelte Laserperforation haben. Gleichzeitig wird durch die beobachtete Calciumwelle ein erster Hinweis darauf gegeben, dass eine zellübergreifende Kommunikation nach der Laserperforation stattfindet. Diese Erkenntnisse sind insbesondere für die GNP-vermittelte Lasertransfektion von Zellen in Multiwellplatten im Hochdurchsatz wichtig. Pro Well werden dort Zehntausende Zellen in wenigen Sekunden prozessiert [85]. Das Ziel ist es, funktionelle Moleküle in möglichst viele Zellen einzubringen und gleichzeitig eine hohe Vitalität der Zellen zu erhalten. Weitere Erkenntnisse zur Auswirkung der zellübergreifenden Kommunikation sowie der Dynamik des Phasenvolumens und des Calciumsignals können ein Schlüssel zur Steigerung der Leistungsfähigkeit der GNP-vermittelten Laserperforation hinsichtlich der Transfektion oder der selektiven Abtötung von Zellen sein.

Bedeutung der Ergebnisse

Nicht nur die Ergebnisse dieser Arbeit, sondern auch die vorgestellte Methodik sind für die Forschung zur GNP-vermittelte Laserperforation von Interesse. Bislang wurde die Reaktion von Einzelzellen als komplexes biophysikalisches System auf die GNP-vermittelte Laserperforation kaum untersucht [103, 165]. Hingegen existieren diverse Studien hinsichtlich der Wirkung von Nanopartikel und Laserstrahlung auf die Plasmamembran auf subzellulärer Ebene [19, 22, 81, 195]. Weiterhin wurde bereits eine Vielzahl an Studien bezüglich der Perforation und Transfektion in Multiwellplatten mit Zehntausenden Zellen pro Well durchgeführt [15, 46, 85, 84, 94, 106, 104, 105, 107, 103, 108]. Die Studien auf subzellulärer Ebene sind im Bereich der Grundlagenforschung angesiedelt, wobei die Studien in Multiwellplatten bereits anwendungsorientiert sind. Eine wesentliche Herausforderung besteht darin, die Ergebnisse der anwendungsorientierten Studien mit den Ergebnissen der Grundlagenforschung zu verbinden. Dies ist nicht zuletzt darin begründet, dass bei der Transfektion in Multiwellplatten etliche biophysikalische Effekte auftreten, die in notwendigerweise vereinfachten Modellsystemen nur schwer beschrieben werden können. Hier setzt die in dieser Arbeit präsentierte Methodik an, indem mit der Untersuchung von Einzelzellen ein Bereich abgedeckt wird, welcher zwischen der Grundlagenforschung und den Studien in Multiwellplatten angeordnet ist. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten multimodalen Bildgebungs- und Perforationsaufbau wurde erstmalig die Reaktion von Einzelzellen auf die GNP-ver-

Bedeutung der Methodik



Abbildung 7.2: Schematische Einordnung der Arbeit in die bestehende Forschung zur GNP-vermittelten Laserperforation und -transfektion. Es existiert bereits eine Reihe an Studien, welche auf subzellulärer Ebene die Wechselwirkung von Nanopartikel, Laser und Plasmamembran untersuchen (linke Box). Ebenso gibt es eine Vielzahl von Arbeiten, bei denen Parameterstudien an Zehntausenden von Zellen in Multiwellplatten zum Zwecke der Transfektion oder selektiven Abtötung im Hochdurchsatz durchgeführt wurden (rechte Box). Die vorliegende Arbeit verbindet diese zwei Klassen von Studien, indem der Einfluss der GNP-vermittelten Laserperforation auf zellulärer Ebene untersucht wird (schwarze Box). Durch Kombination von digitaler Holographie und Fluoreszenzbildgebung wurde erstmalig die Reaktion von Einzelzellen anhand morphologischer und biophysikalischer Messgrößen untersucht.

mittelte Laserperforation mit ps-Laserstrahlung untersucht. Durch die Kombination von digitaler Holographie und Fluoreszenzbildgebung konnten sowohl morphologische als auch biophysikalische Parameter der Zellen gemessen werden. Die digitale Holographie ist dazu besonders geeignet, da sie als markerfreie Methode auf einfache Weise mit der Fluoreszenzbildgebung verknüpft werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Resultate der Untersuchungen an Einzelzellen auch für die Anwendung in Hochdurchsatz-Szenarien von Bedeutung sind. Mit der in dieser Arbeit präsentierten Methodik wird demnach eine Lücke zwischen der Forschung auf subzellulärer Ebene und der anwendungsorientierten Forschung im Hochdurchsatz geschlossen (vgl. Abb. 7.2).

Offene Fragen und Anknüpfungspunkte

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich neue Fragestellungen. Mit der digitalen Holographie konnte ein dynamisches Verhalten des Phasenvolumens der Zellen gemessen werden; es konnte jedoch nicht entschieden werden, ob eine Volumenänderung durch einen Ausstrom von Zytoplasma oder einen Einstrom von Wasser verursacht wird. Dies ist ein grundlegendes Problem der digitalen Holographie, bei der eine integrierte Brechungsindexverteilung gemessen wird. Somit geht in das Phasenvolumen sowohl die Proteinkonzentration innerhalb einer Zelle als auch das Zellvolumen ein (vgl. Abschnitt 4.3). Eine Entkopplung dieser Größen könnte durch die von Rappaz *et al.* vorgestellte Methodik erreicht werden, bei welcher ein Farbstoff mit bekannter Dispersion in das Kulturmedium gegeben wird [156]. Durch Vergleich zweier Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen können die Beiträge der Proteinkonzentration und des Zellvolumens auf das Pha-

senvolumen theoretisch entkoppelt werden; allerdings müssen dazu Annahmen über die Dispersion innerhalb der Zelle getroffen werden. Ein weiterer Weg, die Aussagekraft sowohl der digitalen Holographie als auch der Fluoreszenzbildgebung in den Experimenten zu steigern, ist eine korrelative Bildgebung. Bisher wurden die Messgrößen zwar bei gleichen Parametern aber in unterschiedlichen Experimenten aufgenommen. Wünschenswert ist eine simultane Bildgebung mehrerer Messgrößen an vielen Einzelzellen zur Identifikation von Korrelationen und kausalen Zusammenhängen. So ist insbesondere die Frage interessant, inwiefern die beobachtete exponentielle Änderung des Phasenvolumens mit einer Membranpermeabilisierung oder auch der Vitalität der Zelle verknüpft ist. Weiterhin kann eine korrelative Messung der Ca^{2+} -Konzentration und des Phasenvolumens Aufschluss darüber geben, ob die Änderung des Phasenvolumens durch Wassereinstrom aufgrund einer Erhöhung der intrazellulären Calciumgehalts verursacht ist.

Mit den zuvor diskutierten Ergebnissen ist das Ziel erreicht, *einen experimentellen Aufbau zu entwickeln und zu implementieren, der die Untersuchung der Reaktion von einzelnen Zellen auf die GNP-vermittelte Laserperforation mittels digitaler Holographie und Fluoreszenzbildgebung ermöglicht.*

7.3 ENTWICKLUNG NEUER PHASE UNWRAPPING ALGORITHMEN

In dieser Arbeit wurden neue, robuste Algorithmen zum Phase Unwrapping entwickelt, die eine effiziente Implementierung zulassen. Dies wurde dadurch erreicht, dass ein kachelbasiertes Konzept zum Phase Unwrapping verfolgt wurde, mit dem sich die neu entwickelten Algorithmen mit bestehenden Lösungsansätzen modular kombinieren lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein neuer Kachel-Unwrapper und ein neuer Kachel-Merger Algorithmus vorgestellt. Der MLSQU Kachel-Unwrapper kombiniert das modellbasierte Phase Unwrapping mit Methoden der linearen Algebra und erlaubt damit die Entfaltung großer Kacheln. Der τSRNCP Kachel-Merger überträgt das Konzept des pixelbasierten SRNCP Algorithmus von Herráez *et al.* [87] auf das kachelbasierte Phase Unwrapping. Die hier entwickelten Algorithmen wurden mit dem kachelbasierten BLS Algorithmus und dem pixelbasierten SRNCP Algorithmus verglichen. An synthetischen Phasenverteilungen wurde gezeigt, dass die kachelbasierten Algorithmen eine erhöhte Robustheit gegenüber additivem Rauschen zeigen. Darüber hinaus weisen die in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen eine erhöhte Robustheit gegenüber Residuen durch abgeflachte Sprunglinien auf. Die Kombination der neuen Algorithmen zeigt ausgezeichnete Ergebnisse, selbst für stark verrauschte Daten mit Inkonsistenzen durch Residuen. Diese Ergebnisse wurden an Messdaten aus der digitalen Holographie bestätigt. Die erhöhte Robustheit gegenüber Residuen und Rauschen der MLSQU und τSRNCP Algorithmen geht mit einer Erhöhung der Laufzeit einher und wurde durch Angabe von asymptotischen Komplexitätsklassen quantifiziert (vgl. Abschnitt 6.2.5). In Abb. 7.3 sind die wichtigsten Parameter und Eigenschaften der kachelbasierten Algorithmen zusammengefasst und werden mit bestehenden Algorithmen schematisch ver-

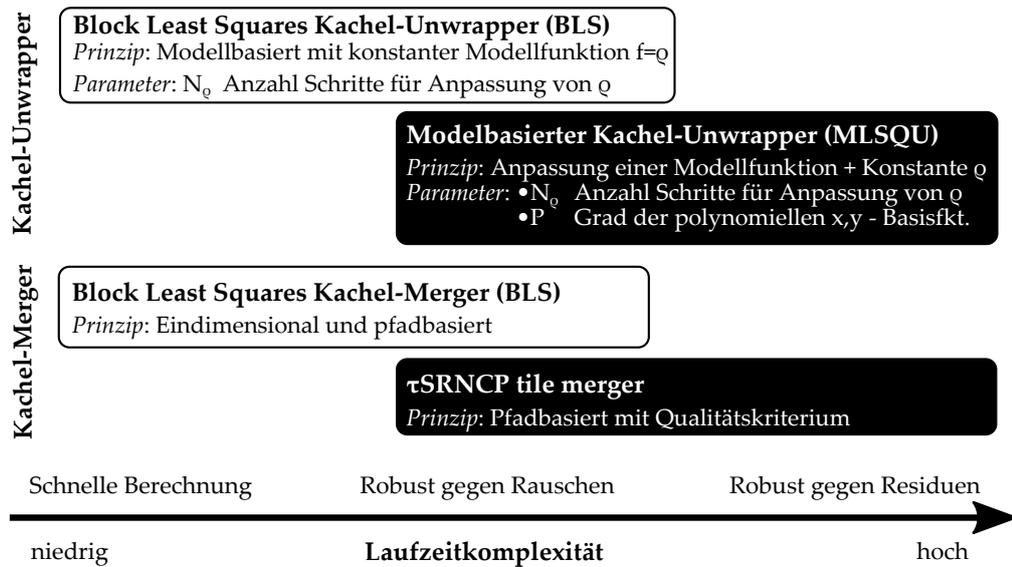


Abbildung 7.3: Schematischer Vergleich der kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen im Hinblick auf Geschwindigkeit und Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Typen von Bildfehlern. Die in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen sind in schwarzen Boxen dargestellt.

glichen. Im Folgenden wird zunächst die Eignung der in dieser Arbeit entwickelten Algorithmen für verschiedene praktische Szenarien evaluiert.

Die Anforderungen an Phase Unwrapping Algorithmen hängen von dem konkreten Anwendungsfall ab. Für die Bildgebung in Echtzeit ist eine geringe Laufzeit unerlässlich, während für eine möglichst fehlerfreie quantitative Bildgebung eine hohe Robustheit gegenüber Rauschen und Residuen nötig ist. In der Regel bedingt letzteres einen erhöhten Rechenaufwand der Phase Unwrapping Algorithmen [10, 87]. Diese Eigenschaften werden für die vorgestellten Phase Unwrapping Algorithmen entscheidend bestimmt von den Parametern, mit denen die Phase entfaltet wird (vgl. Abschnitt 6.2.2). Jeder kachelbasierte Phase Unwrapping Algorithmus hat mindestens drei solcher Parameter. Dies sind erstens die Auswahl des Kachel-Unwrappers, zweitens die Auswahl des Mergers und drittens die Dimensionierung der Kacheln. Weitere Parameter ergeben sich möglicherweise durch die Kachel-Unwrapper und Merger Algorithmen selbst. Beispielsweise ist die Modellfunktion des MLSQU Algorithmus ein Parameter des hier entwickelten Kachel-Unwrappers. Für eine erfolgreiche Entfaltung der Kacheln muss der Verlauf der entfalteten Phasenverteilung auf jeder Kachel hinreichend gut durch eine Anpassung der Modellfunktion beschreibbar sein. Damit hängen die Dimensionierung der Kacheln und die Wahl der Modellfunktion voneinander ab. Beide Parameter wiederum hängen von der zu entfaltenden Phasenverteilung ab. Die Auswahl der Algorithmen zum Kachel-Unwrapping und Merging wird bestimmt von den zu erwartenden Fehlerquellen einerseits sowie von den Anforderungen an die Geschwindigkeit der Entfaltung andererseits. Insgesamt ergibt sich für kachelbasierte Algorithmen ein komplexes Parameterfeld, welches vor dem Phase Unwrapping bestimmt werden muss.

*Parameter der
kachelbasierten
Algorithmen*

Um zu klären, ob der Einsatz der kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen zur Entfaltung von Einzelbildern sinnvoll ist, muss untersucht werden, ob das o.g. Parameterfeld aus einer umgebrochenen Phasenverteilung bestimmt werden kann. Die Voraussetzungen bezüglich Kachelgröße und Form der Modellfunktion beziehen sich jedoch auf die zunächst unbekannte, entfaltete Phase. Für eine Bestimmung der Parameter ist also zumindest eine Näherungslösung für die entfaltete Phase nötig. Das kann durch einen Anwender empirisch erfolgen oder durch einen vorgeschalteten Analyse-Algorithmus. Es ist jedoch zu erwarten, dass für die Analyse ein Zeitaufwand nötig ist, der vergleichbar mit dem Zeitaufwand für ein komplettes Phase Unwrapping ist. Falls sehr hohe Anforderungen an die Qualität des Ergebnisses gestellt werden, kann dieser zusätzliche Aufwand gerechtfertigt sein (vgl. Abschnitt 6.7). Trotzdem werden die kachelbasierten Algorithmen vermutlich nur in wenigen Ausnahmefällen Einsatz zur Entfaltung von Einzelbildern finden.

Entfaltung von Einzelbildern

Wenn die gleichen Parameter für viele Phase Unwrapping Aufgaben wiederverwendet werden können, dann fällt die einmalige Bestimmung der Parameter zeitlich nur wenig ins Gewicht. Das legt die Anwendung der neu entwickelten Algorithmen auf Zeitserien nahe. Unter einer Zeitserie versteht man eine Reihe von digital holographischen Aufnahmen einer Probe zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten. Unter bestimmten Voraussetzungen ist es möglich, anhand eines einzelnen Bildes der Zeitserie das Parameterfeld des kachelbasierten Algorithmus für die ganze Serie zu bestimmen. Dieses ist insbesondere dann der Fall, wenn die Unterschiede der Bilder zwischen den Zeitpunkten der Messung klein sind. Derartige Zeitserien ergaben sich beispielsweise bei der Echtzeitbildgebung in Kapitel 5. Jede einzelne Zeitserie bestand dort aus mehreren tausend Bildern. Der Zeitaufwand der Initialisierung des Parameterfeldes verschwindet dann im Vergleich zu der Entfaltung der ganzen Serie. Zusätzlich können die hier beschriebenen Algorithmen so erweitert werden, dass Zusammenhänge zwischen zeitlich aufeinanderfolgenden Messdaten genutzt werden [93, 68]. Die Entfaltung von Zeitserien ist demnach ein gut geeignetes Anwendungsfeld für die in dieser Arbeit beschriebenen kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmen.

Entfaltung von Zeitserien

Neben den zuvor diskutierten Zeitserien sind auch weitere Fälle denkbar, in denen sich einmalig empirisch bestimmte Parameter weiter verwenden lassen. Insbesondere ist dies dann der Fall, wenn Aufnahmen von gleichartigen Proben gemacht werden. In den Lebenswissenschaften könnte dies z.B. eine Messung von adhärennten Zellen an zufälligen Positionen in einer Kulturschale sein. Eine technische Anwendung stellen beispielsweise mikrostrukturierte Oberflächen oder auch Lichtwellenleiter dar. Wie bei den Zeitserien lassen sich die Parameter von einem Bild auf das nächste übertragen. Allerdings lassen sich darüber hinaus keine Zusammenhänge zwischen den Bildern ausnutzen. Insbesondere der in der Arbeit entwickelte MLSQU Algorithmus kann hier sein volles Potenzial ausschöpfen, da die aufwändigen Berechnungen der Gradientenmatrix nur für das erste Bild durchgeführt werden müssen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Algorithmen sind demnach für die Entfaltung von großen Mengen ähnlicher Messdaten sehr gut geeignet.

Entfaltung von gleichartigen Phasenverteilungen

Insbesondere bei der Echtzeitbildgebung ist eine niedrige Laufzeit der Algorithmen entscheidend. Diese ist auch für die Entfaltung von großen Seri-

Echtzeitbildgebung und Parallelisierung

en wünschenswert. In den letzten Jahren sind Implementierungen von Phase Unwrapping Algorithmen vorgestellt worden, die durch Einsatz von hochgradig parallel rechnender GPU Architektur ein Phase Unwrapping mit Video-Bildraten ermöglichen [149, 64, 95, 109]. Die Laufzeit der in dieser Arbeit entwickelten Phase Unwrapping Software liegt ein bis zwei Größenordnungen über den 40 ms, die für Video-Bildraten nötig sind (vgl. Tabelle 6.1 auf Seite 86). Der eine Grund für diese Laufzeit besteht darin, dass das Programm hochgradig modular entworfen wurde, wobei einzelne Module einen hohen Abstraktionsgrad besitzen. Allein durch die objektorientierte und modulare Struktur entsteht ein Laufzeit-Mehraufwand, der durch eine prozedural orientierte Programmierung auf Kosten der Flexibilität des Programms vermieden werden kann. Der zweite Grund für die vergleichsweise hohe Laufzeit ist, dass in der derzeitigen Version des Programms keine Parallelisierung eingesetzt wurde. Alle Operationen werden sequentiell auf einer einzelnen CPU durchgeführt. Beim kachelbasierten Phase Unwrapping entfällt der größte Teil der Laufzeit auf die Entfaltung der Kacheln. Die Kacheln werden unabhängig voneinander entfaltet, sodass dieser Schritt optimale Voraussetzungen zur parallelen Berechnung bietet. Durch eine parallele Implementierung sind drastische Senkungen der Laufzeit zu erwarten [92, 149]. Als Folge dessen kann eine Echtzeitbildgebung ermöglicht werden. Damit ist also eine niedrige Laufzeit der Algorithmen bei gleichzeitig hoher Robustheit gegenüber Rauschen und Inkonsistenzen in den Messungen zu erwarten. Dies ermöglicht beispielsweise den Einsatz von digitaler Holographie als Mittel zur Online-Überwachung und Regelung biologischer oder technischer Prozesse. In Zukunft könnte auf Basis dieser Algorithmen beispielsweise eine Echtzeitüberwachung für die GNP-vermittelte Laserperforation erreicht werden.

*Automatische
Parameterwahl und
Weiterentwicklung der
Algorithmen*

Wie oben erwähnt, sind die Dimensionen der Kacheln, die Kachel-Unwrapping und Merging Algorithmen sowie deren Einstellungen allesamt Parameter eines kachelbasierten Phase Unwrapping Algorithmus. Soll ein Algorithmus bestimmte Anforderungen erfüllen, so können diese als ein quantifizierbares Ziel definiert werden. Dies können beispielsweise eine minimale Laufzeit oder qualitativ sehr hochwertige Ergebnisse sein. Die Suche nach den Parametern zur bestmöglichen Erfüllung des Ziels kann ihrerseits als ein Optimierungsproblem formuliert werden. Dieses Problem wiederum kann mit einer großen Anzahl von Optimierungs-Algorithmen gelöst werden [159]. Dabei erlaubt die modulare Struktur des Programms eine einfache Variation der Parameter, insbesondere der Kachel-Unwrapping und Merging Algorithmen. Folglich stellen die hier entwickelten Algorithmen, insbesondere deren Veröffentlichung als freie Software, einen ausgezeichneten Ausgangspunkt für die Erschaffung schneller und robuster Phase Unwrapping Algorithmen für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten dar.

Mit den zuvor diskutierten Ergebnissen sind die Ziele erreicht *ein modulares Programm zu schaffen, welches die Entwicklung und den Test neuer Phase Unwrapping Algorithmen ermöglicht und neue und robuste Phase Unwrapping Algorithmen zu erschaffen, die eine effiziente Implementierung zulassen.*

7.4 FAZIT

In dieser Arbeit wurden die Rekonstruktionsverfahren zweier Techniken zur digitalen Bildgebung, SLOT und digitale Holographie, durch neue Algorithmen erweitert und der Einsatz der Techniken zur *in vitro* Analyse von menschlichen und tierischen Zellen demonstriert.

Motiviert durch das Ziel, den Einsatz von SLOT zur *in vitro* Bildgebung für große Probenzahlen zu vereinfachen, wurden die Effekte der Lichtbrechung durch eine Glaskapillare auf die gemessenen Projektionsdaten untersucht. Durch theoretische Berechnungen und numerische Simulationen wurden die durch Lichtbrechung verursachten Rekonstruktionsartefakte beschrieben und analysiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Lichtbrechung an der Kapillare, sondern auch der verwendete tomographische Rekonstruktionsalgorithmus selbst Einfluss auf die Gestalt und Schwere der Artefakte hat. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde ein Korrektur-Algorithmus, die Sinogramm-Entzerrung, entworfen und umgesetzt. Dieser ermöglicht die artefaktfreie Rekonstruktion von Projektionsdaten, die durch Lichtbrechung an einer Glaskapillare verzerrt sind.

Der in dieser Arbeit präsentierte Algorithmus der Sinogramm-Entzerrung entfernt die Effekte der Lichtbrechung durch eine punktweise Neuordnung aus den gemessenen Projektionsdaten. In einem zweiten Schritt können aus diesen Daten tomographische Schnittbilder berechnet werden, indem ein herkömmlicher Rekonstruktionsalgorithmus eingesetzt wird. Die Sinogramm-Entzerrung kann also modular mit beliebigen Rekonstruktionsalgorithmen kombiniert werden. Da die Effekte der Lichtbrechung vor der Rekonstruktion aus den Daten herausgerechnet werden, spielt auch die zuvor beobachtete Abhängigkeit der Gestalt der Artefakte vom Rekonstruktionsalgorithmus keine Rolle. Durch das modulare Konzept können weiterhin die Vorteile spezieller Rekonstruktionsalgorithmen, beispielsweise eine niedrige Rechenzeit oder eine Unterdrückung von Bewegungsartefakten, ausgenutzt werden. Mit dem hier vorgestellten Korrekturalgorithmus war es erstmalig möglich, humane Stammzellaggregate innerhalb einer Glaskapillare *in vitro* mit SLOT zu vermessen. Dadurch konnten volumetrische Datensätze und virtuelle histologische Schnitte generiert werden. Wegen der großen Menge an möglichen Kontrastmechanismen, kombiniert mit der sehr hohen Sammeleffizienz, besitzt SLOT ohnehin ein großes Einsatzpotenzial zur *in vitro* Bildgebung biologischer Organismen. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Korrekturalgorithmus kommt nun die Möglichkeit hinzu, auf einfache Weise eine steril präparierte biologische Probe mit bestehenden SLOT Systemen zu untersuchen. Damit ergeben sich vielversprechende Möglichkeiten für die *in vitro* Bildgebung, insbesondere für große Fallzahlen. Darüber hinaus ist mit der Analyse und Korrektur der Artefakte aufgrund der Glaskapillare auch ein Grundstein zur Erweiterung auf dreidimensionale lichtbrechende Objekte, beispielsweise transparente Freiformflächen, gelegt worden. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann SLOT auf diese Weise auch zur Bildgebung von lichtbrechenden Proben über die Lebenswissenschaften hinaus weiterentwickelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde erstmalig die Untersuchung der GNP-vermittelten Laserperforation mit der Kombination von digitaler Holographie

und Fluoreszenzbildgebung vorgestellt. Mit einem eigens dafür entwickelten Bildgebungs- und Perforationsaufbau wurde die Reaktion von Zellen auf die GNP-vermittelte Laserperforation anhand morphologischer und biophysikalischer Parameter untersucht. Dabei konnte in Abhängigkeit von den verwendeten Bestrahlungsparametern ein dynamisches Verhalten des Zellvolumens sowie ein intra- und interzelluläres Calciumsignal beobachtet werden. Sowohl ein Anstieg der Calciumkonzentration als auch eine Änderung des Zellvolumens können regulatorische Prozesse auslösen, die einen Einfluss auf das Überleben einer Zelle haben. Somit sind die Ergebnisse dieser Studie auch für die GNP-vermittelte Laserperforation und -transfektion im Hochdurchsatz von Bedeutung. Mithilfe des hier präsentierten multimodalen Bildgebungs- und Perforationsaufbaus konnte eine Brücke zwischen der bestehenden Grundlagenforschung auf subzellulärer Ebene und der anwendungsorientierten Forschung zur GNP-vermittelten Lasertransfektion im Hochdurchsatz geschlagen werden. Weiterführende Arbeiten mit dieser Methodik können dazu beitragen, die Etablierung der GNP-vermittelten Laserperforation als Methode zur Transfektion oder selektiven Abtötung von Zellen in den Lebenswissenschaften weiter voranzutreiben.

Mit dem Ziel der Erschaffung schneller und robuster Phase Unwrapping Algorithmen wurden im Rahmen dieser Arbeit neuartige kachelbasierte Algorithmen zum Phase Unwrapping entwickelt und implementiert. Phase Unwrapping stellt einen wichtigen Schritt in der digitalen Rekonstruktion für die digitale Holographie dar. Dieser Schritt reagiert empfindlich auf Rauschen und Inkonsistenzen in den Messdaten. In dieser Arbeit wurde ein Konzept verfolgt, bei dem das Phase Unwrapping erst auf einzelnen Kacheln des Bildes unabhängig voneinander durchgeführt wird. In einem zweiten Schritt werden die Kacheln zu einer entfalteten Phasenverteilung zusammengefügt. Die Entwicklung und Implementierung der Algorithmen erfolgte in einem eigens entworfenen und unter freier Lizenz veröffentlichten, modularen Programm. Die modulare Struktur vereinfacht die Einbettung schon bestehender Konzepte sowie die Entwicklung und den Test neuer Algorithmen. Die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Algorithmen besitzen sowohl durch das kachelbasierte Konzept als auch durch die effiziente Nutzung von linearer Algebra ausgezeichnete Voraussetzungen für schnelle und parallele Implementierungen. Darüber hinaus sind die Algorithmen hochgradig robust gegen Fehler in den Messdaten. Dadurch sind sie ideal für die Anwendung zur Entfaltung von großen Mengen von Messdaten sowie von Zeitserien geeignet. Durch die Erschaffung parallelisierbarer und hochgradig robuster Rekonstruktionsalgorithmen wurde die Anwendbarkeit der digitalen Holographie auch zur Echtzeit-Bildgebung und Prozesskontrolle wirkungsvoll gesteigert.

Sowohl die Leistungsfähigkeit von SLOT als auch der digitalen Holographie wurden in dieser Arbeit durch Erweiterung der Rekonstruktionsalgorithmen signifikant erhöht und somit für beide Techniken neue Anwendungsgebiete erschlossen.

HERLEITUNGEN DER FORMELN ZUR LICHTBRECHUNG IN SLOT

Im Folgenden werden die Formeln in Abschnitt 3.2.1 hergeleitet. Dazu werden zunächst einige Hilfsaussagen bewiesen. Die Bezeichnungen der Strecken und Winkel sind in Abb. A.1 auf Seite auf der nächsten Seite gezeigt. Die Abbildung setzt einen Strahleinfall parallel zur z -Achse voraus. Dies entspricht einem Einfallswinkel von $\theta = \pi/2$. Aufgrund der Rotationssymmetrie des Problems kann jeder einfallende Strahl in einen parallel zur z -Achse verlaufenden Strahl transformiert werden. Die anhand von Abb. A.1 bewiesenen Aussagen sind demnach allgemein gültig. Aus physikalischen Gründen kann weiterhin für alle Winkel $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Delta\theta$ ein Wertebereich von $[0, \pi/2]$ angenommen werden. Die Herleitung nimmt weiterhin $n_{\text{kap}} \geq n_{\text{med}}$ an, sodass die geometrischen Zusammenhänge wie in der obigen Skizze vorliegen. Dies stellt in praktischen Szenarien keine Einschränkung dar, da der Brechungsindex einer Glaskapillare in der Regel stets höher als der Brechungsindex von Zellkulturmedium ist [166].

EINFACHE ZUSAMMENHÄNGE FÜR DIE WINKEL $\alpha, \beta, \gamma, \delta$. Aus der Geometrie des Problems folgt

$$\sin \alpha = \frac{\rho}{r_a} \quad (\text{A.1})$$

$$\sin \delta = \frac{\rho'}{r_i}. \quad (\text{A.2})$$

Zudem sind die Winkel α, β und γ, δ über das Brechungsgesetz verknüpft:

$$n_{\text{med}} \sin \alpha = n_{\text{kap}} \sin \beta \quad (\text{A.3})$$

$$n_{\text{kap}} \sin \gamma = n_{\text{med}} \sin \delta. \quad (\text{A.4})$$

LÄNGE ℓ DES STRAHL S IN DER KAPILLARWAND. Mit dem Kosinussatz folgt

$$r_i^2 = r_a^2 + \ell^2 - 2r_a \ell \cdot \cos \beta. \quad (\text{A.5})$$

Daraus folgen zwei Lösungen für ℓ . Die Lösung mit dem kleineren Wert ist

$$\ell = r_a \cos \beta + \sqrt{r_a^2 \cos^2 \beta + r_i^2 - r_a^2} \quad (\text{A.6})$$

und entspricht der Länge des Strahls in der Kapillarewand. Zur Beschreibung der Propagation des Strahls in der Kapillarewand wird ein Vektor $\vec{\ell}$ definiert. Dieser besitze die zuvor berechnete Länge ℓ und die Ausbreitungsrichtung des Strahls in der Kapillarewand. Diese Richtung ist durch Anwendung des Brechungsgesetzes an der äußeren Wand der Kapillare gegeben. Tatsächlich

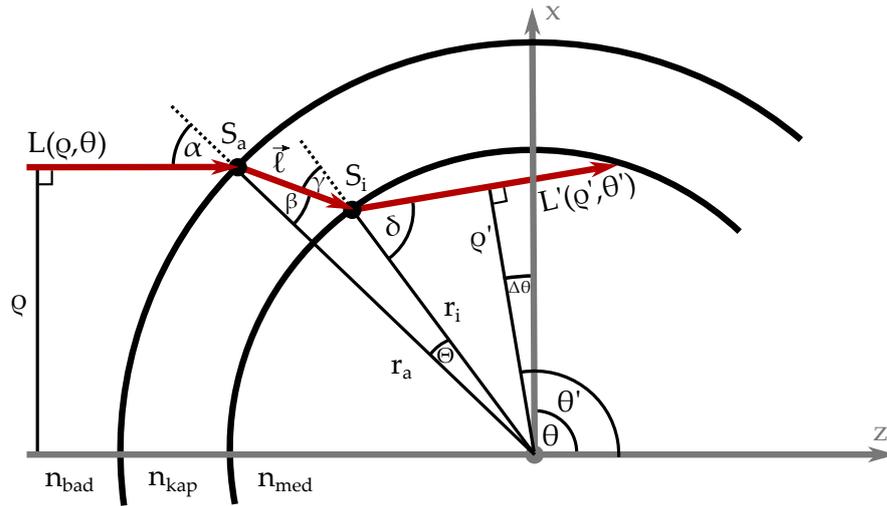


Abbildung A.1: Skizze der Bezeichnungen und des Koordinatensystem für die Herleitungen. Vergleiche dazu auch Abb. 3.1 aus Abschnitt 3.2.1.

kann ℓ ohne explizite Abhängigkeit von dem Winkel β formuliert werden. Dazu wird ausgenutzt, dass allgemein $\cos^2 \beta = 1 - \sin^2 \beta$ gilt. Nach Einsetzen von Gleichungen A.1 und A.3 ergibt sich nach einigen Umformungen:

$$\ell = \sqrt{r_a^2 - \left(\frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho\right)^2} - \sqrt{r_i^2 - \left(\frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho\right)^2}. \quad (\text{A.7})$$

AUSDRUCK FÜR DEN WINKEL γ . Dies ist der Winkel des Strahls, der durch die Kapillarwand verläuft zum Lot auf die Innere Grenzfläche der Kapillare. Sei $\vec{\ell}$ der wie zuvor definierte Vektor und weiterhin \vec{S}_a und \vec{S}_i die Aufpunktvektoren vom Mittelpunkt der Kapillare zu den Schnittpunkten S_a , S_i des Strahls mit der äußeren bzw. inneren Grenzfläche der Kapillare. Es gilt offensichtlich:

$$\vec{S}_i = \vec{S}_a + \vec{\ell} \quad (\text{A.8})$$

Der Einheitsvektor $\vec{\ell}^0 := \vec{\ell}/\ell$ gibt die Ausbreitungsrichtung des Strahls in der Kapillarwand an. Multiplikation von Gleichung A.8 mit $\vec{\ell}^0$ und umformen ergibt:

$$\ell = r_a \cos \beta + r_i \cos \gamma. \quad (\text{A.9})$$

Dazu wird ausgenutzt, dass die Längen der Vektoren \vec{S}_a und \vec{S}_i den Radien r_a , bzw. r_i der Kapillare entsprechen. Aus Gleichungen A.6 und A.9 folgt:

$$r_i \cos \gamma = \sqrt{r_a^2 \cos^2 \beta + r_i^2 - r_a^2}$$

Nach quadrieren dieser Gleichung und einsetzen von $\cos^2 \gamma = 1 - \sin^2 \gamma$ folgt:

$$\begin{aligned} \sin^2 \gamma &= \left(\frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \frac{\rho}{r_i}\right)^2 \\ \Rightarrow \sin \gamma &= \frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \frac{\rho}{r_i} \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

wobei die letzte Zeile sich aus der Bedingung $\gamma \in [0, \pi/2]$ ergibt. Mit Gleichungen A.1 und A.3 folgt daraus

$$\sin \gamma = \frac{r_a}{r_i} \cdot \frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \sin \alpha = \frac{r_a}{r_i} \cdot \sin \beta. \quad (\text{A.11})$$

HERLEITUNG VON GLEICHUNG 3.1. Durch Umformung von Gleichung A.2 und sukzessives Einsetzen von Gleichungen A.4, A.11 und schließlich A.1 folgt

$$\begin{aligned} \rho' &= r_i \sin \delta \\ &= \frac{n_{\text{kap}}}{n_{\text{med}}} \cdot r_i \sin \gamma \\ &= \frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{med}}} \cdot r_a \sin \alpha \\ &= \frac{n_{\text{bad}}}{n_{\text{med}}} \cdot \rho. \end{aligned}$$

Die gewünschte Gleichung ergibt sich in der letzten Zeile. Tatsächlich lässt sich dieses Resultat auch auf elegante Weise herleiten, indem ein Kreis mit Radius r betrachtet wird, außerhalb dessen ein Brechungsindex n_1 und innerhalb dessen ein Brechungsindex n_2 vorliegt. In diesem Fall kann der Zusammenhang $\rho' = n_1/n_2 \rho$ für die Koordinaten eines einfallenden Strahls leicht in wenigen Schritten gezeigt werden. Die Gleichung 3.1 folgt dann aus der Verkettung der Brechung an zwei konzentrischen Kreisen.

HERLEITUNG VON GLEICHUNGEN 3.1 UND 3.2. Für den Winkelversatz $\Delta\theta$ folgt aus Abb. A.1:

$$\Delta\theta = \delta - \alpha - \Theta. \quad (\text{A.12})$$

Die Winkel $\alpha = \sin^{-1}(\rho/r_a) = \sin^{-1}(n_{\text{med}}/n_{\text{bad}} \cdot \rho'/r_a)$ und $\delta = \sin^{-1}(\rho'/r_i)$ werden aus den Gleichungen A.1 und A.2 berechnet. Für eine explizite Darstellung von $\Delta\theta$ fehlt noch ein Zusammenhang für den Winkel ϵ . Dieser ergibt sich aus dem Kosinussatz für den Winkel ϵ :

$$\ell^2 = r_i^2 + r_a^2 - 2r_i r_a \cos \epsilon.$$

Einsetzen der Gleichung A.7 und liefert nach einigen Umformungen:

$$\Theta = \cos^{-1} \left(\frac{\left(\frac{n_{\text{med}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho' \right)^2 + \sqrt{r_a^2 - \left(\frac{n_{\text{med}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho' \right)^2} \cdot \sqrt{r_i^2 - \left(\frac{n_{\text{med}}}{n_{\text{kap}}} \cdot \rho' \right)^2}}{r_i r_a} \right). \quad (\text{A.13})$$

Damit folgen die Gleichungen aus Abschnitt 3.2.1.

BEWEIS DER UNGLEICHUNG 3.6. Zuerst wird gezeigt, dass $\Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{kap}}} > \Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{med}}}$ an allen Positionen $\rho' \neq 0$ gilt. Aus der Konstruktion in Abb. A.1 lässt sich einsehen, dass der Winkel Θ stets größer 0 ist außer für einen Strahleinfall senkrecht zur Kapillare. Dies entspricht genau der Position $\rho = 0$. Mit $\Theta > 0$ für $\rho \neq 0$ folgt $\Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{kap}}} > \Delta\theta(\rho')|_{n_{\text{bad}}=n_{\text{med}}} \forall \rho' \neq 0$. Daraus folgt nach Integration die Behauptung.

EINGESETZTE SOFTWARE

Diese Arbeit wurde mit `LyX` verfasst und mit `MIKTeX` gesetzt. Zur tomographischen Rekonstruktion wurde `IMOD` und die `OCTAVE` Bibliothek `OPENRECON` verwendet. Zur Bildbearbeitung wurde `IMAGEJ` eingesetzt. Diagramme wurden mit `ORIGINLAB` `ORIGIN` erstellt. Zur Grafikbearbeitung und zur Erstellung von Vektorgrafiken wurde `INKSCAPE` eingesetzt. Für die Erstellung von dreidimensionalen Renderings wurde `VOREEN` eingesetzt. Für Teile der Simulationen zur Lichtbrechung wurde `OCTAVE` verwendet. Dies ist an entsprechender Stelle angegeben. Für die Erstellung der `SLOT Control Software` und der Software zum Phase Unwrapping wurde die `NETBEANS C++` Umgebung verwendet. Zur Kompilierung des Quellcodes wurde `MINGW g++` in den 32-bit und 64-bit Varianten verwendet. Dabei wurden die `FFTW`, `EIGEN` und `BOOST` Bibliotheken eingesetzt. Für die Erstellung von graphischen Benutzeroberflächen in `C++` wurde das `Qt Framework` verwendet. Mit Ausnahme von `Origin` sind alle diese Software-Pakete unter freier Lizenz erhältlich.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ABRÀMOFF, Michael D. ; MAGALHÃES, Paulo J. ; RAM, Sunanda J.: Image processing with ImageJ. In: *Biophotonics international* 11 (2004), Nr. 7, S. 36–42 (Zitiert auf Seite 59.)
- [2] ADI, Kusworo ; SUKSMONO, Andriyan B. ; MENGKO, Tati Latifah R. ; GUNAWAN, Hendra: Phase unwrapping by Markov chain Monte Carlo energy minimization. In: *Geoscience and Remote Sensing Letters, IEEE* 7 (2010), Nr. 4, S. 704–707 (Zitiert auf Seite 77.)
- [3] ALTKORN, R ; KOEV, I ; VAN DUYN, RP ; LITORJA, M: Low-loss liquid-core optical fiber for low-refractive-index liquids: fabrication, characterization, and application in Raman spectroscopy. In: *Applied optics* 36 (1997), Nr. 34, S. 8992–8998 (Zitiert auf Seite 23.)
- [4] AMBALE, Bharath ; DENNEY JR, Thomas S. ; GUPTA, Himanshu ; LLOYD, Steven ; DELL'ITALIA, Louis: 3D left ventricular strain by phase unwrapping: a simulated annealing based branch-cut placement method. In: *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE, 2009*, S. 466–469 (Zitiert auf Seite 48.)
- [5] AMBROSE, James: Computerised transverse axial scanning (Tomography): II Clinical Application. In: *Brit. J. Radiol* 46 (1973), S. 679–95 (Zitiert auf Seite 1.)
- [6] ANDERSEN, AH ; KAK, Avinash C.: Simultaneous algebraic reconstruction technique (SART): a superior implementation of the ART algorithm. In: *Ultrasonic imaging* 6 (1984), Nr. 1, S. 81–94 (Zitiert auf den Seiten 16 und 29.)
- [7] ANTONOPOULOS, Georgios C. ; STELTNER, Benjamin ; HEISTERKAMP, Alexander ; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Tile-Based Two-Dimensional Phase Unwrapping for Digital Holography Using a Modular Framework. In: *PloS one* 10 (2015), Nr. 11 (Zitiert auf den Seiten 47, 79, 81, 83 und 85.)
- [8] ANTONOPOULOS, Georgios C. ; PSCHENIZA, Dimitri ; LORBEER, Raoul-Amadeus ; HEIDRICH, Marko ; SCHWANKE, Kristin ; ZWEIGERDT, Robert ; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Correction of image artifacts caused by refractive index gradients in scanning laser optical tomography. In: *SPIE BiOS International Society for Optics and Photonics, 2014*, S. 894907–894907 (Zitiert auf den Seiten 26, 32 und 33.)
- [9] AOYAGI, Yuka ; KAWAKAMI, Ryosuke ; OSANAI, Hisayuki ; HIBI, Terumasa ; NEMOTO, Tomomi: A Rapid Optical Clearing Protocol Using 2, 2'-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain. In: *PloS one* 10 (2015), Nr. 1, S. e0116280 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)

- [10] BALDI, Antonio: Two-dimensional phase unwrapping by quad-tree decomposition. In: *Appl. Opt.* 40 (2001), Mar, Nr. 8, 1187–1194. <http://dx.doi.org/10.1364/AO.40.001187>. – DOI 10.1364/AO.40.001187 (Zitiert auf den Seiten 6, 48 und 96.)
- [11] BARER, R: Interference microscopy and mass determination. In: *Nature* 169 (1952), S. 366–367 (Zitiert auf Seite 3.)
- [12] BARNHILL, Eric ; KENNEDY, Paul ; JOHNSON, Curtis L. ; MADA, Marius ; ROBERTS, Neil: Real-time 4D phase unwrapping applied to magnetic resonance elastography. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 73 (2015), Nr. 6, S. 2321–2331 (Zitiert auf Seite 6.)
- [13] BASSI, Andrea ; FIERAMONTI, Luca ; D'ANDREA, Cosimo ; MIONE, Marina ; VALENTINI, Gianluca: In vivo label-free three-dimensional imaging of zebrafish vasculature with optical projection tomography. In: *Journal of biomedical optics* 16 (2011), Nr. 10, S. 100502–100502 (Zitiert auf Seite 2.)
- [14] BAUMGART, Judith ; HUMBERT, Laure ; BOULAIS, Étienne ; LACHAINE, Rémi ; LEBRUN, Jean-Jaques ; MEUNIER, Michel: Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells. In: *Biomaterials* 33 (2012), Nr. 7, S. 2345–2350 (Zitiert auf Seite 5.)
- [15] BEGANDT, Daniela ; BADER, Almke ; ANTONOPOULOS, Georgios C. ; SCHOMAKER, Markus ; KALIES, Stefan ; MEYER, Heiko ; RIPKEN, Tammo ; NGEZAHAYO, Anaclet: Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: a new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 47 (2015), Nr. 5, S. 441–449 (Zitiert auf den Seiten 5 und 93.)
- [16] BHADURI, Basanta ; PHAM, Hoa ; MIR, Mustafa ; POPESCU, Gabriel: Diffraction phase microscopy with white light. In: *Optics letters* 37 (2012), Nr. 6, S. 1094–1096 (Zitiert auf den Seiten 41 und 42.)
- [17] BIRK, Udo J. ; DARRELL, Alex ; KONSTANTINIDES, Nikos ; SARASA-RENEDO, Ana ; RIPOLL, Jorge: Improved reconstructions and generalized filtered back projection for optical projection tomography. In: *Applied optics* 50 (2011), Nr. 4, S. 392–398 (Zitiert auf den Seiten 4, 20, 89 und 91.)
- [18] BIRK, Udo J. ; RIECKHER, Matthias ; KONSTANTINIDES, Nikos ; DARRELL, Alex ; SARASA-RENEDO, Ana ; MEYER, Heiko ; TAVERNARAKIS, Nektarios ; RIPOLL, Jorge: Correction for specimen movement and rotation errors for in-vivo Optical Projection Tomography. In: *Biomedical optics express* 1 (2010), Nr. 1, S. 87–96 (Zitiert auf Seite 91.)
- [19] BISKER, Gili ; YELIN, Dvir: Noble-metal nanoparticles and short pulses for nanomanipulations: theoretical analysis. In: *JOSA B* 29 (2012), Nr. 6, S. 1383–1393 (Zitiert auf Seite 93.)
- [20] BOEER, Ulrike ; BUETTNER, Falk F. ; KLINGENBERG, Melanie ; ANTONOPOULOS, Georgios C. ; MEYER, Heiko ; HAVERICH, Axel ; WILHELMI, Mathias: Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is

- conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI. In: *PLoS ONE* 9 (2014), Nr. 8, S. e105964. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105964>. – DOI 10.1371/journal.pone.0105964 (Zitiert auf Seite 4.)
- [21] BOLOMEY, Jean-Charles ; PICHOT, Christian: Microwave tomography: from theory to practical imaging systems. In: *International Journal of Imaging Systems and Technology* 2 (1990), Nr. 2, S. 144–156 (Zitiert auf Seite 1.)
- [22] BOULAIS, E t. ; LACHAINE, Re m. ; MEUNIER, Michel: Plasma mediated off-resonance plasmonic enhanced ultrafast laser-induced nanocavitation. In: *Nano letters* 12 (2012), Nr. 9, S. 4763–4769 (Zitiert auf Seite 93.)
- [23] BROWN, Carl S. ; BURNS, David H. ; SPELMAN, Francis A. ; NELSON, Alan C.: Computed tomography from optical projections for three-dimensional reconstruction of thick objects. In: *Applied optics* 31 (1992), Nr. 29, S. 6247–6254 (Zitiert auf Seite 1.)
- [24] BUTLER, Robert D.: *Immersion liquids of intermediate refraction*. 1932 (Zitiert auf Seite 23.)
- [25] CACACE, Veronica I. ; FINKELSTEYN, Andres G. ; TASSO, Laura M. ; KUSNIER, Carlos F. ; GOMEZ, Karina A. ; FISCHBARG, Jorge: Regulatory Volume Increase and Regulatory Volume Decrease Responses in HL-1 Atrial Myocytes. In: *Cellular Physiology and Biochemistry* 33 (2014), Nr. 6, S. 1745–1757 (Zitiert auf Seite 65.)
- [26] CANDÈS, Emmanuel J. ; ROMBERG, Justin ; TAO, Terence: Robust uncertainty principles: Exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information. In: *Information Theory, IEEE Transactions on* 52 (2006), Nr. 2, S. 489–509 (Zitiert auf den Seiten 13, 16, 29 und 91.)
- [27] CASTRO, Alberto de ; BARBERO, Sergio ; ORTIZ, Sergio ; MARCOS, Susana: Accuracy of the reconstruction of the crystalline lens gradient index with optimization methods from ray tracing and Optical Coherence Tomography data. In: *Optics express* 19 (2011), Nr. 20, S. 19265–19279 (Zitiert auf Seite 92.)
- [28] CHARRAS, Guillaume T. ; HU, Chi-Kuo ; COUGHLIN, Margaret ; MITCHISON, Timothy J.: Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. In: *The Journal of cell biology* 175 (2006), Nr. 3, S. 477–490 (Zitiert auf Seite 68.)
- [29] CHAVEZ, Sofia ; XIANG, Qing-San ; AN, Li: Understanding phase maps in MRI: a new cutline phase unwrapping method. In: *Medical Imaging, IEEE Transactions on* 21 (2002), Nr. 8, S. 966–977 (Zitiert auf den Seiten 45 und 48.)
- [30] CHEN, Curtis W. ; ZEBKER, Howard A.: Network approaches to two-dimensional phase unwrapping: intractability and two new algorithms. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 17 (2000), Mar, Nr. 3, 401–414. <http://dx.doi.org/10.1364/JOSAA.17.000401>. – DOI 10.1364/JOSAA.17.000401 (Zitiert auf Seite 48.)

- [31] CHEN, Ke ; XI, Jiangtao ; YU, Yanguang ; CHICHARO, Joe F.: Fast quality-guided flood-fill phase unwrapping algorithm for three-dimensional fringe pattern profilometry. In: *Photonics Asia 2010* International Society for Optics and Photonics, 2010, S. 78550X–78550X (Zitiert auf Seite 48.)
- [32] CHEN, Minghui J. ; SEPRAMANIAM, Sugunavathi ; ARMUGAM, Arunmozhiarasi ; CHOY, Meng S. ; MANIKANDAN, Jayapal ; MELENDEZ, Alirio J. ; JEYASEELAN, Kandiah ; CHEUNG, Nam S.: Water and ion channels: crucial in the initiation and progression of apoptosis in central nervous system? In: *Current neuropharmacology* 6 (2008), Nr. 2, S. 102 (Zitiert auf Seite 93.)
- [33] CHUNG, Kwanghun ; WALLACE, Jenelle ; KIM, Sung-Yon ; KALYANASUNDARAM, Sandhiya ; ANDALMAN, Aaron S. ; DAVIDSON, Thomas J. ; MIRZABEKOV, Julie J. ; ZALOCUSKY, Kelly A. ; MATTIS, Joanna ; DENISIN, Aleksandra K. u. a.: Structural and molecular interrogation of intact biological systems. In: *Nature* 497 (2013), Nr. 7449, S. 332–337 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)
- [34] CLAPHAM, David E.: Calcium signaling. In: *Cell* 80 (1995), Nr. 2, S. 259–268 (Zitiert auf Seite 93.)
- [35] CORMACK, Allan M.: Representation of a function by its line integrals, with some radiological applications. In: *Journal of applied physics* 34 (1963), Nr. 9, S. 2722–2727 (Zitiert auf Seite 1.)
- [36] COSTANTINI, Mario: A novel phase unwrapping method based on network programming. In: *Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactions on* 36 (1998), Nr. 3, S. 813–821 (Zitiert auf Seite 48.)
- [37] CUCHE, Etienne ; BEVILACQUA, Frederic ; DEPEURSINGE, Christian: Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. In: *Optics letters* 24 (1999), Nr. 5, S. 291–293 (Zitiert auf Seite 3.)
- [38] CUI, Xiquan ; LEW, Matthew ; YANG, Changhui: Quantitative differential interference contrast microscopy based on structured-aperture interference. In: *Applied Physics Letters* 93 (2008), Nr. 9, S. 091113 (Zitiert auf Seite 3.)
- [39] DAVENPORT, Mark A. ; DUARTE, Marco F. ; ELDAR, Yonina C. ; KUTYNIOK, Gitta: Introduction to compressed sensing. In: *Preprint* 93 (2011), S. 1–64 (Zitiert auf Seite 16.)
- [40] DAVIES, HG ; WILKINS, MHF: Interference microscopy and mass determination. In: *Nature* 169 (1952), S. 541 (Zitiert auf Seite 3.)
- [41] DAVIES, HG ; WILKINS, MHF ; CHAYEN, J ; LA COUR, LF: The use of the interference microscope to determine dry mass in living cells and as a quantitative cytochemical method. In: *Quarterly journal of microscopical science* 3 (1954), Nr. 31, S. 271–304 (Zitiert auf Seite 56.)
- [42] DEL GRANDE, NA ; DURBIN, PF ; GORVAD, MR: Infrared computed tomography. (1994) (Zitiert auf Seite 1.)

- [43] DEMTRÖDER, Wolfgang: *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. 3. Springer-Verlag, 2004 (Zitiert auf den Seiten 11 und 12.)
- [44] DIAS, José MB ; LEITÃO, José MN: The Z π M algorithm: a method for interferometric image reconstruction in SAR/SAS. In: *Image Processing, IEEE Transactions on* 11 (2002), Nr. 4, S. 408–422 (Zitiert auf den Seiten 77 und 78.)
- [45] DILMANIAN, FA ; ZHONG, Z ; REN, B ; WU, XY ; CHAPMAN, LD ; ORION, I ; THOMLINSON, WC: Computed tomography of x-ray index of refraction using the diffraction enhanced imaging method. In: *Physics in medicine and biology* 45 (2000), Nr. 4, S. 933 (Zitiert auf Seite 2.)
- [46] DURÁN, María C. ; WILLENBROCK, Saskia ; BARCHANSKI, Annette ; MULLER, JM ; MAIOLINI, Arianna ; SOLLER, Jan T. ; BARCIKOWSKI, Stephan ; NOLTE, Ingo ; FEIGE, Karsten ; MURUA ESCOBAR, Hugo: Comparison of nanoparticle-mediated transfection methods for DNA expression plasmids: efficiency and cytotoxicity. In: *J Nanobiotechnology* 9 (2011), S. 47 (Zitiert auf Seite 93.)
- [47] EATON, John W. u. a.: *GNU Octave*. <http://www.octave.org> (Zitiert auf Seite 22.)
- [48] EDELSTEIN, Arthur ; AMODAJ, Nenad ; HOOVER, Karl ; VALE, Ron ; STURMAN, Nico: Computer control of microscopes using μ Manager. In: *Current protocols in molecular biology* (2010), S. 14–20 (Zitiert auf Seite 59.)
- [49] EGIDI, N ; MAPONI, P: A comparative study of two fast phase unwrapping algorithms. In: *Applied mathematics and computation* 148 (2004), Nr. 3, S. 599–629 (Zitiert auf Seite 46.)
- [50] EICKHOFF, René ; LORBEER, Raoul-Amadeus ; SCHEIBLICH, Hannah ; HEISTERKAMP, Alexander ; MEYER, Heiko ; STERN, Michael ; BICKER, Gerd: Scanning laser optical tomography resolves structural plasticity during regeneration in an insect brain. In: *PloS one* 7 (2012), Nr. 7, S. e41236 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)
- [51] ERTÜRK, Ali ; BECKER, Klaus ; JÄHRLING, Nina ; MAUCH, Christoph P. ; HOJER, Caroline D. ; EGEN, Jackson G. ; HELLAL, Farida ; BRADKE, Frank ; SHENG, Morgan ; DODT, Hans-Ulrich: Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. In: *Nature protocols* 7 (2012), Nr. 11, S. 1983–1995 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)
- [52] ESCOBAR, H M. ; MEYER, B ; RICHTER, A ; BECKER, K ; FLOHR, AM ; BULLERDIEK, J ; NOLTE, I: Molecular characterization of the canine HMGB1. In: *Cytogenetic and genome research* 101 (2003), Nr. 1, S. 33–38 (Zitiert auf Seite 59.)
- [53] FAUVER, Mark ; SEIBEL, Eric ; RAHN, J R. ; MEYER, Michael ; PATTEN, Florence ; NEUMANN, Thomas ; NELSON, Alan: Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography. In: *Optics Express* 13 (2005), Nr. 11, S. 4210–4223 (Zitiert auf Seite 2.)

- [54] FERRARO, Pietro ; DE NICOLA, Sergio ; FINIZIO, Andrea ; COPPOLA, Giuseppe ; GRILLI, Simonetta ; MAGRO, Carlo ; PIERATTINI, Giovanni: Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging. In: *Applied optics* 42 (2003), Nr. 11, S. 1938–1946 (Zitiert auf Seite 55.)
- [55] FERRARO, Pietro ; WAX, Adam ; ZALEVSKY, Zeev: *Coherent light microscopy: imaging and quantitative phase analysis*. Bd. 46. Springer Science & Business Media, 2011 (Zitiert auf den Seiten 3, 5, 39, 55, 56 und 64.)
- [56] FESSLER, J: Analytical tomographic image reconstruction methods. In: *Image Reconstruction: Algorithms and Analysis* 66 (2009), S. 67 (Zitiert auf den Seiten 13 und 14.)
- [57] FLANNERY, Brian P. ; PRESS, William H. ; TEUKOLSKY, Saul A. ; VETTERLING, William: Numerical recipes in C. In: *Press Syndicate of the University of Cambridge, New York* 24 (1992) (Zitiert auf den Seiten 22 und 72.)
- [58] FLYNN, Thomas J.: Two-dimensional phase unwrapping with minimum weighted discontinuity. In: *JOSA A* 14 (1997), Nr. 10, S. 2692–2701 (Zitiert auf Seite 48.)
- [59] FRANK, Joachim: *Electron tomography*. Springer, 1992 (Zitiert auf Seite 1.)
- [60] FRIEDLANDER, Benjamin ; FRANCOIS, Joseph M.: Model based phase unwrapping of 2-D signals. In: *Signal Processing, IEEE Transactions on* 44 (1996), Nr. 12, S. 2999–3007 (Zitiert auf den Seiten 48 und 50.)
- [61] FRIKEL, Jürgen u. a.: *Reconstructions in limited angle x-ray tomography: Characterization of classical reconstructions and adapted curvelet sparse regularization*, PhD Thesis, Diss., 2013 (Zitiert auf Seite 29.)
- [62] GABOR, Dennis: Holography, 1948-1971 [Nobel Lecture, December 13, 1971]. In: *Soviet Physics Uspekhi* 16 (1973), S. 5–30 (Zitiert auf Seite 3.)
- [63] GABOR, Dennis u. a.: A new microscopic principle. In: *Nature* 161 (1948), Nr. 4098, S. 777–778 (Zitiert auf den Seiten 3 und 39.)
- [64] GAO, Wenjing ; KEMAO, Qian ; WANG, Haixia ; LIN, Feng ; SEAH, Hock S.: Parallel computing for fringe pattern processing: A multicore CPU approach in MATLAB® environment. In: *Optics and Lasers in Engineering* 47 (2009), Nr. 11, S. 1286–1292 (Zitiert auf Seite 98.)
- [65] GHIGLIA, Dennis C. ; PRITT, Mark D.: *Two-dimensional phase unwrapping: theory, algorithms, and software*. Wiley New York:, 1998 (Zitiert auf Seite 48.)
- [66] GHIGLIA, Dennis C. ; ROMERO, Louis A.: Robust two-dimensional weighted and unweighted phase unwrapping that uses fast transforms and iterative methods. In: *JOSA A* 11 (1994), Nr. 1, S. 107–117 (Zitiert auf Seite 48.)

- [67] GIRSHOVITZ, Pinhas ; SHAKED, Natan T.: Compact and portable low-coherence interferometer with off-axis geometry for quantitative phase microscopy and nanoscopy. In: *Optics express* 21 (2013), Nr. 5, S. 5701–5714 (Zitiert auf Seite 46.)
- [68] GOLDSTEIN, Goldie L.: *Smart Temporal Phase Unwrapping for Biological Objects*. <http://hdl.handle.net/10150/311573>. Version: 2013 (Zitiert auf den Seiten 78 und 97.)
- [69] GOLDSTEIN, Richard M. ; ZEBKER, Howard A. ; WERNER, Charles L.: Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping. In: *Radio science* 23 (1988), Nr. 4, S. 713–720 (Zitiert auf den Seiten 46 und 48.)
- [70] GOODMAN, Joseph W. ; LAWRENCE, RW: Digital image formation from electronically detected holograms. In: *Applied physics letters* 11 (1967), Nr. 3, S. 77–79 (Zitiert auf Seite 3.)
- [71] GRAHAM, Leroy C.: Synthetic interferometer radar for topographic mapping. In: *Proceedings of the IEEE* 62 (1974), Nr. 6, S. 763–768 (Zitiert auf Seite 45.)
- [72] GRUNA, Robin: *Beleuchtungsverfahren zur problemspezifischen Bildgewinnung für die automatische Sichtprüfung*. Bd. 8. KIT Scientific Publishing, 2015 (Zitiert auf Seite 12.)
- [73] GUAN, Huaiqun ; GORDON, Richard: A projection access order for speedy convergence of ART (algebraic reconstruction technique): a multilevel scheme for computed tomography. In: *Physics in medicine and biology* 39 (1994), Nr. 11, S. 2005 (Zitiert auf Seite 16.)
- [74] GUILLET, Jean P. ; RECUR, Benoit ; FREDERIQUE, Louis ; BOUSQUET, Bruno ; CANIONI, Lionel ; MANEK-HÖNNINGER, Inka ; DESBARATS, Pascal ; MOUNAIX, Patrick: Review of Terahertz tomography techniques. In: *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* 35 (2014), Nr. 4, S. 382–411 (Zitiert auf Seite 1.)
- [75] GUTHRIE, Peter B. ; KNAPPENBERGER, Joshua ; SEGAL, Menahem ; BENNETT, Michael V. ; CHARLES, Andrew C. ; KATER, SB: ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. In: *The Journal of neuroscience* 19 (1999), Nr. 2, S. 520–528 (Zitiert auf Seite 68.)
- [76] GUTMANN, Bernd ; WEBER, Herbert: Phase unwrapping with the branch-cut method: role of phase-field direction. In: *Applied optics* 39 (2000), Nr. 26, S. 4802–4816 (Zitiert auf den Seiten 47 und 78.)
- [77] HAMA, Hiroshi ; HIOKI, Hiroyuki ; NAMIKI, Kana ; HOSHIDA, Tetsushi ; KUROKAWA, Hiroshi ; ISHIDATE, Fumiyoshi ; KANEKO, Takeshi ; AKAGI, Takumi ; SAITO, Takashi ; SAIDO, Takaomi u. a.: ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. In: *Nature Neuroscience* 18 (2015), Nr. 10, S. 1518–1529 (Zitiert auf Seite 2.)

- [78] HAMA, Hiroshi ; KUROKAWA, Hiroshi ; KAWANO, Hiroyuki ; ANDO, Ryo-ko ; SHIMOGORI, Tomomi ; NODA, Hisayori ; FUKAMI, Kiyoko ; SAKAUE-SAWANO, Asako ; MIYAWAKI, Atsushi: Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. In: *Nature neuroscience* 14 (2011), Nr. 11, S. 1481–1488 (Zitiert auf Seite 4.)
- [79] HARRACH, Bastian von: *Regularisierung inverser Probleme*. <http://www.mathematik.uni-stuttgart.de/~harrach/lehre/Regularisierung.pdf>, 2014. – Online, Version vom 30.11.2015 (Zitiert auf Seite 15.)
- [80] HARRINGTON, V. F. ; BUERGER, M. J.: Immersion liquids of low refraction. In: *The American Mineralogist* 16 (1931), Nr. 2 (Zitiert auf Seite 23.)
- [81] HASHIMOTO, Shuichi ; WERNER, Daniel ; UWADA, Takayuki: Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 13 (2012), Nr. 1, S. 28–54 (Zitiert auf Seite 93.)
- [82] HEIDRICH, Marko: *SLOT: Eine auf optischer Computertomographie basierende Bildgebungsmethode für die Lebenswissenschaften*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Diss., 2015 (Zitiert auf den Seiten 2, 4, 17, 18, 19, 28, 33 und 91.)
- [83] HEIDRICH, Marko ; KÜHNEL, Mark P. ; KELLNER, Manuela ; LORBEER, Raoul-Amadeus ; LANGE, Tineke ; WINKEL, Andreas ; STIESCH, Meike ; MEYER, Heiko ; HEISTERKAMP, Alexander: 3D imaging of biofilms on implants by detection of scattered light with a scanning laser optical tomograph. In: *Biomedical optics express* 2 (2011), Nr. 11, S. 2982–2994 (Zitiert auf den Seiten 2, 4 und 91.)
- [84] HEINEMANN, D ; KALIES, S ; SCHOMAKER, M ; ERTMER, W ; ESCOBAR, H M. ; MEYER, H ; RIPKEN, T: Delivery of proteins to mammalian cells via gold nanoparticle mediated laser transfection. In: *Nanotechnology* 25 (2014), Nr. 24, S. 245101 (Zitiert auf den Seiten 5, 59 und 93.)
- [85] HEINEMANN, Dag ; SCHOMAKER, Markus ; KALIES, Stefan ; SCHIECK, Maximilian ; CARLSON, Regina ; ESCOBAR, H M. ; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko ; HEISTERKAMP, Alexander: Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down. In: *Plos one* 8 (2013), Nr. 3, S. e58604 (Zitiert auf den Seiten 5, 59, 60 und 93.)
- [86] HERRAEZ, Miguel A. ; BURTON, David R. ; LALOR, Michael J. ; CLEGG, David B.: Robust, simple, and fast algorithm for phase unwrapping. In: *Applied optics* 35 (1996), Nr. 29, S. 5847–5852 (Zitiert auf Seite 48.)
- [87] HERRÁEZ, Miguel A. ; BURTON, David R. ; LALOR, Michael J. ; GDEISAT, Munther A.: Fast two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path. In: *Applied Optics* 41 (2002), Nr. 35, S. 7437–7444 (Zitiert auf den Seiten 6, 48, 49, 50, 51, 52, 73, 95 und 96.)

- [88] HOFFMANN, Else K. ; LAMBERT, Ian H. ; PEDERSEN, Stine F.: Physiology of cell volume regulation in vertebrates. In: *Physiological reviews* 89 (2009), Nr. 1, S. 193–277 (Zitiert auf Seite 93.)
- [89] HOUNSFIELD, Godfrey N.: Computerised transverse axial scanning (Tomography): I Description of System. In: *Brit. J. Radiol* 46 (1973), S. 1016–1022 (Zitiert auf Seite 1.)
- [90] HOUNSFIELD, Godfrey N.: Nobel lecture, 8 December 1979. Computed medical imaging. In: *Journal de radiologie* 61 (1980), Nr. 6-7, S. 459 (Zitiert auf Seite 1.)
- [91] HSIEH, Jiang ; NETT, Brian ; YU, Zhou ; SAUER, Ken ; THIBAUT, Jean-Baptiste ; BOUMAN, Charles A.: Recent advances in CT image reconstruction. In: *Current Radiology Reports* 1 (2013), Nr. 1, S. 39–51 (Zitiert auf den Seiten 13 und 14.)
- [92] HUMPHREY, John R. ; PRICE, Daniel K. ; SPAGNOLI, Kyle E. ; PAOLINI, Aaron L. ; KELMELIS, Eric J.: CULA: hybrid GPU accelerated linear algebra routines. In: *SPIE Defense, Security, and Sensing International Society for Optics and Photonics*, 2010, S. 770502–770502 (Zitiert auf Seite 98.)
- [93] HUNTLEY, Jonathan M. ; SALDNER, H.: Temporal phase-unwrapping algorithm for automated interferogram analysis. In: *Applied Optics* 32 (1993), Nr. 17, S. 3047–3052 (Zitiert auf Seite 97.)
- [94] HUSCHKA, Ryan ; BARHOUMI, Aoune ; LIU, Qing ; ROTH, Jack A. ; JI, Lin ; HALAS, Naomi J.: Gene silencing by gold nanoshell-mediated delivery and laser-triggered release of antisense oligonucleotide and siRNA. In: *ACS nano* 6 (2012), Nr. 9, S. 7681–7691 (Zitiert auf Seite 93.)
- [95] HWANG, Wen-Jyi ; CHENG, Shih-Chang ; CHENG, Chau-Jern: Efficient phase unwrapping architecture for digital holographic microscopy. In: *Sensors* 11 (2011), Nr. 10, S. 9160–9181 (Zitiert auf Seite 98.)
- [96] ISEROVICH, Pavel ; REINACH, Peter S. ; YANG, Hua ; FISCHBARG, Jorge: A novel approach to resolve cellular volume responses to an anisotonic challenge. In: *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes* 2. Springer, 1998, S. 687–692 (Zitiert auf Seite 65.)
- [97] ITOH, K.: Analysis of the phase unwrapping algorithm. In: *Appl Opt* 21 (1982), Jul, Nr. 14, S. 2470 (Zitiert auf den Seiten 45 und 46.)
- [98] JIANG, Ming ; WANG, Ge: Convergence of the simultaneous algebraic reconstruction technique (SART). In: *Image Processing, IEEE Transactions on* 12 (2003), Nr. 8, S. 957–961 (Zitiert auf Seite 16.)
- [99] JØRGENSEN, Jakob S. ; SIDKY, EY: How little data is enough? Phase-diagram analysis of sparsity-regularized X-ray computed tomography. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 373 (2015), Nr. 2043, S. 20140387 (Zitiert auf Seite 16.)

- [100] JUDGE, Thomas R. ; BRYANSTON-CROSS, PJ: A review of phase unwrapping techniques in fringe analysis. In: *Optics and Lasers in Engineering* 21 (1994), Nr. 4, S. 199–239 (Zitiert auf Seite 48.)
- [101] KACZMARZ, Stefan: Angenäherte Auflösung von Systemen linearer Gleichungen. In: *Bulletin International de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres* 35 (1937), S. 355–357 (Zitiert auf Seite 16.)
- [102] KAK, Avinash C. ; SLANEY, Malcolm: *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE Press, 1988 (Zitiert auf den Seiten 13, 14, 15 und 30.)
- [103] KALIES, Stefan ; ANTONOPOULOS, Georgios C. ; RAKOSKI, Mirko S. ; HEINEMANN, Dag ; SCHOMAKER, Markus ; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Investigation of Biophysical Mechanisms in Gold Nanoparticle Mediated Laser Manipulation of Cells Using a Multimodal Holographic and Fluorescence Imaging Setup. In: *PLOS ONE* 10 (2015), Apr, Nr. 4, e0124052. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124052>. – DOI 10.1371/journal.pone.0124052. – ISSN 1932–6203 (Zitiert auf den Seiten 58, 59, 60, 61, 63, 64, 67, 68 und 93.)
- [104] KALIES, Stefan ; BIRR, Tobias ; HEINEMANN, Dag ; SCHOMAKER, Markus ; RIPKEN, Tammo ; HEISTERKAMP, Alexander ; MEYER, Heiko: Enhancement of extracellular molecule uptake in plasmonic laser perforation. In: *Journal of biophotonics* 9 (2013), S. 1–9 (Zitiert auf den Seiten 5, 60 und 93.)
- [105] KALIES, Stefan ; GENTEMANN, Lara ; SCHOMAKER, Markus ; HEINEMANN, Dag ; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Surface modification of silica particles with gold nanoparticles as an augmentation of gold nanoparticle mediated laser perforation. In: *Biomedical optics express* 5 (2014), Nr. 8, S. 2686–2696 (Zitiert auf den Seiten 5 und 93.)
- [106] KALIES, Stefan ; HEINEMANN, Dag ; SCHOMAKER, Markus ; ESCOBAR, Hugo M. ; HEISTERKAMP, Alexander ; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Plasmonic laser treatment for Morpholino oligomer delivery in antisense applications. In: *J. Biophotonics* 7 (2013), Nr. 10, S. 825–833 (Zitiert auf den Seiten 5, 59, 65 und 93.)
- [107] KALIES, Stefan ; HEINEMANN, Dag ; SCHOMAKER, Markus ; GENTEMANN, Lara ; MEYER, Heiko ; RIPKEN, Tammo: Immobilization of gold nanoparticles on cell culture surfaces for safe and enhanced gold nanoparticle-mediated laser transfection. In: *Journal of biomedical optics* 19 (2014), Nr. 7, S. 070505–070505 (Zitiert auf den Seiten 5 und 93.)
- [108] KALIES, Stefan ; KEIL, Sebastian ; SENDER, Sina ; HAMMER, Susanne C. ; ANTONOPOULOS, Georgios C. ; SCHOMAKER, Markus ; RIPKEN, Tammo ; ESCOBAR, Hugo M. ; MEYER, Heiko ; HEINEMANN, Dag: Characterization of the cellular response triggered by gold nanoparticle-mediated laser manipulation. In: *Journal of biomedical optics* 20 (2015), Nr. 11, S. 115005–115005 (Zitiert auf Seite 93.)
- [109] KARASEV, Peter A. ; CAMPBELL, Daniel P. ; RICHARDS, Mark u. a.: Obtaining a 35x speedup in 2d phase unwrapping using commodity graphics

- processors. In: *Radar Conference, 2007 IEEE IEEE*, 2007, S. 574–578 (Zitiert auf Seite 98.)
- [110] KAWATA, S ; NAKAMURA, O ; MINAMI, S: Optical microscope tomography. I. Support constraint. In: *JOSA A* 4 (1987), Nr. 1, S. 292–297 (Zitiert auf Seite 1.)
- [111] KAWATA, Satoshi ; TOUKI, Yusuke ; MINAMI, Shigeo: *Optical Microscopic Tomography*. <http://dx.doi.org/10.1117/12.949566>. Version: 1985 (Zitiert auf Seite 1.)
- [112] KELLNER, Manuela ; HEIDRICH, Marko ; BEIGEL, Rebecca ; LORBEER, Raoul-Amadeus ; KNUDSEN, Lars ; RIPKEN, Tammo ; HEISTERKAMP, Alexander ; MEYER, Heiko ; KÜHNEL, Mark P. ; OCHS, Matthias: Imaging of the mouse lung with scanning laser optical tomography (SLOT). In: *Journal of Applied Physiology* 113 (2012), Nr. 6, S. 975–983 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)
- [113] KELLNER, Manuela ; WEHLING, Judith ; WARNECKE, Gregor ; HEIDRICH, Marko ; IZYKOWSKI, Nicole ; VOGEL-CLAUSSEN, Jens ; LORBEER, Raoul-Amadeus ; ANTONOPOULOS, Georgios ; JANCIAUSKIENE, Sabina ; GROTHAUSMANN, Roman u. a.: Correlating 3D morphology with molecular pathology: fibrotic remodelling in human lung biopsies. In: *Thorax* 70 (2015), Nr. 12, S. 1197–1198 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)
- [114] KEMPER, Björn ; CARL, Daniel ; SCHNEKENBURGER, Jürgen ; BREDEBUSCH, Ilona ; SCHÄFER, Marcus ; DOMSCHKE, Wolfram ; BALLY, Gert von: Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. In: *Journal of biomedical optics* 11 (2006), Nr. 3, S. 034005–034005 (Zitiert auf Seite 55.)
- [115] KEMPER, Björn ; VOLLMER, Angelika ; ROMMEL, Christina E. ; SCHNEKENBURGER, Jürgen ; BALLY, Gert von: Simplified approach for quantitative digital holographic phase contrast imaging of living cells. In: *Journal of biomedical optics* 16 (2011), Nr. 2, S. 026014–026014 (Zitiert auf den Seiten 40, 41, 46 und 58.)
- [116] KEMPER, Björn ; WIBBELING, Jana ; KASTL, Lena ; SCHNEKENBURGER, Jürgen ; KETELHUT, Steffi: Multimodal label-free growth and morphology characterization of different cell types in a single culture with quantitative digital holographic phase microscopy. In: *SPIE BiOS International Society for Optics and Photonics*, 2015, S. 933617–933617 (Zitiert auf Seite 3.)
- [117] KIM, Myung K.: *Digital Holographic Microscopy*. Springer, 2011 (Zitiert auf den Seiten 3, 5, 39, 40 und 42.)
- [118] KOEPPE, Robert A. ; BRUGGER, Robert M. ; SCHLAPPER, Gerald A. ; LARSEN, Gregory N. ; JOST, Randy J.: Neutron computed tomography. In: *Journal of computer assisted tomography* 5 (1981), Nr. 1, S. 79–88 (Zitiert auf Seite 1.)

- [119] KREIS, Thomas: Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method. In: *JOSA A* 3 (1986), Nr. 6, S. 847–855 (Zitiert auf Seite 42.)
- [120] KREMER, James R. ; MASTRONARDE, David N. ; McINTOSH, J R.: Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. In: *Journal of structural biology* 116 (1996), Nr. 1, S. 71–76 (Zitiert auf den Seiten 28 und 90.)
- [121] LANGLEY, Jason ; ZHAO, Qun: A model-based 3D phase unwrapping algorithm using Gegenbauer polynomials. In: *Physics in medicine and biology* 54 (2009), Nr. 17, S. 5237 (Zitiert auf den Seiten 50 und 51.)
- [122] LEYBAERT, Luc ; SANDERSON, Michael J.: Intercellular Ca²⁺ waves: mechanisms and function. In: *Physiological reviews* 92 (2012), Nr. 3, S. 1359–1392 (Zitiert auf Seite 68.)
- [123] LI, Chen ; ZHU, Dai-Yin: A residue-pairing algorithm for insar phase unwrapping. In: *Progress In Electromagnetics Research* 95 (2009), S. 341–354 (Zitiert auf den Seiten 47 und 48.)
- [124] LI, Meihua ; YANG, Haiquan ; KUDO, Hiroyuki: An accurate iterative reconstruction algorithm for sparse objects: application to 3D blood vessel reconstruction from a limited number of projections. In: *Physics in medicine and biology* 47 (2002), Nr. 15, S. 2599 (Zitiert auf Seite 16.)
- [125] LORBEER, Marc-Ruben: *Realisierung linearer und nichtlinearer Rekonstruktionsansätze auf der CUDA-Architektur zur Rekonstruktion optischer computertomographischer Daten*, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Diplomarbeit, 2011 (Zitiert auf Seite 90.)
- [126] LORBEER, R.A. ; MEYER, H. ; HEIDRICH, M. ; HEISTERKAMP, A.: *Technik zur tomographischen Bilderfassung*. <http://www.google.com/patents/DE102010063412B4?cl=de>. Version: Juni 6 2013. – DE Patent 102,010,063,412 (Zitiert auf Seite 2.)
- [127] LORBEER, Raoul-Amadeus: *Quantifizierung optischer Systeme für die optische Tomographie*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Diss., 2012 (Zitiert auf den Seiten 2, 4, 12, 13, 17 und 90.)
- [128] LORBEER, Raoul-Amadeus ; HEIDRICH, Marko ; LORBEER, Christina ; RAMÍREZ OJEDA, Diego F. ; BICKER, Gerd ; MEYER, Heiko ; HEISTERKAMP, Alexander: Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph. In: *Optics express* 19 (2011), Nr. 6, S. 5419–5430 (Zitiert auf den Seiten 2, 4 und 92.)
- [129] LOSSI, Laura ; MERIGHI, Adalberto: *Neuronal Cell Death: Methods and Protocols*. Springer New York, 2015 (Zitiert auf Seite 93.)
- [130] LU, Xiaoqiang ; SUN, Yi ; YUAN, Yuan: Optimization for limited angle tomography in medical image processing. In: *Pattern Recognition* 44 (2011), Nr. 10, S. 2427–2435 (Zitiert auf Seite 92.)

- [131] MARROQUIN, Jose L. ; TAPIA, Maximino ; RODRIGUEZ-VERA, Ramon ; SERVIN, Manuel: Parallel algorithms for phase unwrapping based on Markov random field models. In: *JOSA A* 12 (1995), Nr. 12, S. 2578–2585 (Zitiert auf den Seiten 46 und 48.)
- [132] MASTRONARDE, David N.: Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. In: *Journal of structural biology* 120 (1997), Nr. 3, S. 343–352 (Zitiert auf den Seiten 15 und 28.)
- [133] MCGINTY, James ; TAHIR, Khadija B. ; LAINE, Romain ; TALBOT, Clifford B. ; DUNSBY, Christopher ; NEIL, Mark A. ; QUINTANA, Laura ; SWOGER, James ; SHARPE, James ; FRENCH, Paul M.: Fluorescence lifetime optical projection tomography. In: *Journal of biophotonics* 1 (2008), Nr. 5, S. 390–394 (Zitiert auf Seite 2.)
- [134] MEYBERG, Kurt ; VACHENAUER, Peter: *Höhere Mathematik 1: Differential- und Integralrechnung Vektor- und Matrizenrechnung*. Springer-Verlag, 2013 (Zitiert auf Seite 77.)
- [135] MEYER, Heiko ; DARRELL, Alex ; METAXAKIS, Athanasios ; SAVAKIS, Charalambos ; RIPOLL, Jorge: Optical projection tomography for in-vivo imaging of drosophila melanogaster. In: *Microscopy and Analysis-UK* (2008), Nr. 127, S. 19 (Zitiert auf Seite 2.)
- [136] MEYROWITZ, Robert ; LARSEN, ES: Immersion liquids of high refractive index. In: *American Mineralogist* Bd. 36 MINERALOGICAL SOC AMER 1015 EIGHTEENTH ST, NW SUITE 601, WASHINGTON, DC 20036, 1951, S. 321–321 (Zitiert auf Seite 23.)
- [137] MOHEBI, Saleh ; RAU, T ; MEYER, H ; LENARZ, T ; MAJDANI, O: Imaging of the human inner ear with scanning laser optical tomography (SLOT). In: *85. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V.*, 2014 (Zitiert auf Seite 4.)
- [138] MONEMHAGHDOUST, Zahra ; MONTFORT, Frédéric ; EMERY, Yves ; DEPEUR-SINGE, Christian ; MOSER, Christophe: Off-axis digital holographic camera for quantitative phase microscopy. In: *Biomedical optics express* 5 (2014), Nr. 6, S. 1721 (Zitiert auf Seite 40.)
- [139] MULISCH, Maria ; WELSCH, Ulrich: *Romeis-Mikroskopische Technik*. Springer-Verlag, 2010 (Zitiert auf Seite 3.)
- [140] NAKAMURA, O ; KAWATA, S ; MINAMI, S: Optical microscope tomography. II. Nonnegative constraint by a gradient-projection method. In: *JOSA A* 5 (1988), Nr. 4, S. 554–561 (Zitiert auf Seite 1.)
- [141] OSMANOGLU, Batuhan ; DIXON, Timothy H. ; WDOWINSKI, Shimon ; CABRAL-CANO, Enrique: On the importance of path for phase unwrapping in synthetic aperture radar interferometry. In: *Applied Optics* 50 (2011), Nr. 19, S. 3205–3220 (Zitiert auf den Seiten 46 und 48.)

- [142] PAMPALONI, Francesco ; CHANG, Bo-Jui ; STELZER, Ernst H.: Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues. In: *Cell and tissue research* 360 (2015), Nr. 1, S. 129–141 (Zitiert auf den Seiten 4, 19 und 91.)
- [143] PAMPALONI, Francesco ; REYNAUD, Emmanuel G. ; STELZER, Ernst H.: The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 8 (2007), Nr. 10, S. 839–845 (Zitiert auf den Seiten 1 und 4.)
- [144] PAN, Xiaochuan ; SIDKY, Emil Y. ; VANNIER, Michael: Why do commercial CT scanners still employ traditional, filtered back-projection for image reconstruction? In: *Inverse problems* 25 (2009), Nr. 12, S. 123009 (Zitiert auf den Seiten 15, 16, 28 und 91.)
- [145] PARK, HJ ; PARK, Y: Quantitative Phase Imaging Techniques for the Study of Cell Pathophysiology: From Principles to Applications. (2013) (Zitiert auf den Seiten 3, 5 und 40.)
- [146] PATNAIK, Pradyot: *Handbook of inorganic chemicals*. Bd. 28. McGraw-Hill New York, 2003 (Zitiert auf Seite 23.)
- [147] PAVILLON, Nicolas: Cellular dynamics and three-dimensional refractive index distribution studied with quantitative phase imaging. (2011) (Zitiert auf den Seiten 5, 39, 41, 42, 44 und 68.)
- [148] PAVILLON, Nicolas ; BENKE, Alexander ; BOSS, Daniel ; MORATAL, Corinne ; KÜHN, Jonas ; JOURDAIN, Pascal ; DEPEURSINGE, Christian ; MAGISTRETTI, Pierre J. ; MARQUET, Pierre: Cell morphology and intracellular ionic homeostasis explored with a multimodal approach combining epifluorescence and digital holographic microscopy. In: *Journal of biophotonics* 3 (2010), Nr. 7, S. 432–436 (Zitiert auf den Seiten 3 und 68.)
- [149] PHAM, Hoa ; DING, Huafeng ; SOBH, Nahil ; DO, Minh ; PATEL, Sanjay ; POPESCU, Gabriel: Off-axis quantitative phase imaging processing using CUDA: toward real-time applications. In: *Biomedical optics express* 2 (2011), Nr. 7, S. 1781–1793 (Zitiert auf den Seiten 6, 46, 48 und 98.)
- [150] POPESCU, Gabriel ; PARK, YoungKeun ; LUE, Niyom ; BEST-POPESCU, Catherine ; DEFLORES, Lauren ; DASARI, Ramachandra R. ; FELD, Michael S. ; BADIZADEGAN, Kamran: Optical imaging of cell mass and growth dynamics. In: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295 (2008), Nr. 2, S. C538–C544 (Zitiert auf Seite 3.)
- [151] PRITT, Mark D. ; SHIPMAN, Jerome S.: Least-squares two-dimensional phase unwrapping using FFT's. In: *Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactions on* 32 (1994), Nr. 3, S. 706–708 (Zitiert auf Seite 48.)
- [152] QUINTANA, Laura ; SHARPE, James: Optical projection tomography of vertebrate embryo development. In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2011 (2011), Nr. 6, S. pdb-top116 (Zitiert auf Seite 2.)

- [153] QUIROGA, JA ; BERNABEU, E: Phase-unwrapping algorithm for noisy phase-map processing. In: *Applied optics* 33 (1994), Nr. 29, S. 6725–6731 (Zitiert auf Seite 48.)
- [154] RADON, J: Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. In: *Ber. Säch. Akad. Wiss.* 69 (1917), S. 262–277 (Zitiert auf den Seiten 1, 13 und 14.)
- [155] RAPPAZ, Benjamin ; CANO, Elena ; COLOMB, Tristan ; KÜHN, Jonas ; DEPEURSINGE, Christian ; SIMANIS, Viesturs ; MAGISTRETTI, Pierre J. ; MARQUET, Pierre: Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy. In: *Journal of biomedical optics* 14 (2009), Nr. 3, S. 034049–034049 (Zitiert auf Seite 3.)
- [156] RAPPAZ, Benjamin ; CHARRIÈRE, Florian ; DEPEURSINGE, Christian ; MAGISTRETTI, Pierre J. ; MARQUET, Pierre: Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium. In: *Optics letters* 33 (2008), Nr. 7, S. 744–746 (Zitiert auf Seite 94.)
- [157] RAPPAZ, Benjamin ; MARQUET, Pierre ; CUCHE, Etienne ; EMERY, Yves ; DEPEURSINGE, Christian ; MAGISTRETTI, Pierre: Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. In: *Optics express* 13 (2005), Nr. 23, S. 9361–9373 (Zitiert auf Seite 56.)
- [158] RIECKHER, Matthias ; BIRK, Udo J. ; MEYER, Heiko ; RIPOLL, Jorge ; TAVERNARAKIS, Nektarios: Microscopic optical projection tomography in vivo. (2011) (Zitiert auf den Seiten 2 und 91.)
- [159] RIOS, Luis M. ; SAHINIDIS, Nikolaos V.: Derivative-free optimization: a review of algorithms and comparison of software implementations. In: *Journal of Global Optimization* 56 (2013), Nr. 3, S. 1247–1293 (Zitiert auf Seite 98.)
- [160] SAEZ, Juan C. ; CONNOR, John A. ; SPRAY, David C. ; BENNETT, MV: Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1, 4, 5-trisphosphate, and to calcium ions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (1989), Nr. 8, S. 2708–2712 (Zitiert auf Seite 68.)
- [161] SAIKA, Yohei ; UEZU, Tatsuya: Bayesian Inference for Phase Unwrapping using Multiple Interferograms Based on Statistical Mechanics of Three-state Ising Model. In: *Recent Advances in Electrical and Computer Engineering Bayesian* (2014), S. 23–28. ISBN 9781618042286 (Zitiert auf Seite 48.)
- [162] SCHNARS, Ulf ; JÜPTNER, Werner: Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. In: *Applied optics* 33 (1994), Nr. 2, S. 179–181 (Zitiert auf Seite 3.)
- [163] SCHOFIELD, Marvin A. ; ZHU, Yimei: Fast phase unwrapping algorithm for interferometric applications. In: *Optics letters* 28 (2003), Nr. 14, S. 1194–1196 (Zitiert auf den Seiten 46 und 48.)

- [164] SCHOMAKER, Markus ; BAUMGART, Judith ; NGEZAHAYO, Anaclet ; BULLERDIEK, Jörn ; NOLTE, Ingo ; ESCOBAR, Hugo M. ; LUBATSCHOWSKI, Holger ; HEISTERKAMP, Alexander: Plasmonic perforation of living cells using ultrashort laser pulses and gold nanoparticles. In: *SPIE BiOS: Biomedical Optics International Society for Optics and Photonics*, 2009, S. 71920U–71920U (Zitiert auf Seite 5.)
- [165] SCHOMAKER, Markus ; KILLIAN, Doreen ; WILLENBROCK, Saskia ; HEINEMANN, Dag ; KALIES, Stefan ; NGEZAHAYO, Anaclet ; NOLTE, Ingo ; RIPKEN, Tammo ; JUNGHANSS, Christian ; MEYER, Heiko u. a.: Biophysical effects in off-resonant gold nanoparticle mediated (GNOME) laser transfection of cell lines, primary-and stem cells using fs laser pulses. In: *Journal of biophotonics* 9999 (2014) (Zitiert auf den Seiten 5 und 93.)
- [166] SCHOTT: Optical Glass 2014 / Schott. Version: 2014. http://www.schott.com/advanced_optics/english/download/schott-optical-glass-pocket-catalog-january-2014-row.pdf. 2014. – Forschungsbericht (Zitiert auf den Seiten 23 und 103.)
- [167] SHAKED, Natan T. ; ZALEVSKY, Zeev ; SATTERWHITE, Lisa L.: *Biomedical optical phase microscopy and nanoscopy*. Academic Press, 2012 (Zitiert auf den Seiten 3, 5 und 42.)
- [168] SHARMA, Kriti S. ; JIN, Xin ; CHEN, Zhiqiang ; LI, Liang ; YU, Hengyong ; WANG, Ge: OpenRecon Reference Manual. (2014). <http://www.bid.sbes.vt.edu/software/openrecon/> (Zitiert auf den Seiten 29, 90 und 92.)
- [169] SHARPE, James: Optical projection tomography. In: *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6 (2004), S. 209–228 (Zitiert auf Seite 1.)
- [170] SHARPE, James: Optical Projection Tomography. In: *Advanced Imaging in Biology and Medicine*. Springer, 2009, S. 199–224 (Zitiert auf den Seiten 2 und 13.)
- [171] SHARPE, James ; AHLGREN, Ulf ; PERRY, Paul ; HILL, Bill ; ROSS, Allyson ; HECKSHER-SØRENSEN, Jacob ; BALDOCK, Richard ; DAVIDSON, Duncan: Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. In: *Science* 296 (2002), Nr. 5567, S. 541–545 (Zitiert auf den Seiten 2, 13 und 92.)
- [172] SHEPP, Lawrence A. ; LOGAN, Benjamin F.: The Fourier reconstruction of a head section. In: *Nuclear Science, IEEE Transactions on* 21 (1974), Nr. 3, S. 21–43 (Zitiert auf Seite 28.)
- [173] SINGH, Amardeep S. ; ANAND, Arun ; LEITGEB, Rainer A. ; JAVIDI, Bahram: Lateral shearing digital holographic imaging of small biological specimens. In: *Optics express* 20 (2012), Nr. 21, S. 23617–23622 (Zitiert auf Seite 40.)
- [174] SMITH, Nicholas I. ; FUJITA, Katsumasa ; KANEKO, Tomoyuki ; KATO, Kentaro ; NAKAMURA, Osamu ; KAWATA, Satoshi ; TAKAMATSU, Tetsuro:

- Generation of calcium waves in living cells by pulsed-laser-induced photodisruption. In: *Applied Physics Letters* 79 (2001), S. 1208 (Zitiert auf Seite 68.)
- [175] SPILLER, Eberhard ; FEDER, R.: X-ray optics. In: *SPIE, Bellingham, WA Citeseer*, 1994 (Zitiert auf Seite 2.)
- [176] STAM, JOS ; LANGUÉNOU, ERIC: Ray tracing in non-constant media. In: *Rendering Techniques* 96. Springer, 1996, S. 225–234 (Zitiert auf den Seiten 11 und 12.)
- [177] STELTNER, Benjamin: *Entwicklung und Implementation eines Algorithmus zum Phase Unwrapping*, Leibniz Universität Hannover, Bachelorarbeit, 2015 (Zitiert auf den Seiten 75, 84, 86 und 87.)
- [178] STEPHENSON, Paul ; BURTON, David R. ; LALOR, Michael J.: Data validation techniques in a tiled phase unwrapping algorithm. In: *Optical Engineering* 33 (1994), Nr. 11, S. 3703–3708 (Zitiert auf Seite 49.)
- [179] STEVENS, John K. ; MILLS, Linda R. ; TROGADIS, Judy E.: *Three-dimensional confocal microscopy: volume investigation of biological specimens*. Elsevier Science, 1994 (Zitiert auf Seite 1.)
- [180] STOER, Josef ; BAUER, Friedrich L. ; BULIRSCH, Roland: *Numerische Mathematik*. Bd. 8. Springer, 1989 (Zitiert auf Seite 72.)
- [181] STRAMAGLIA, Sebastiano ; NICO, Giovanni ; PASQUARIELLO, Guido ; GUERRIERO, Luciano: Phase-unwrapping method based on stochastic relaxation. In: *Proc. SPIE* 3217 (1997), 4-12. <http://dx.doi.org/10.1117/12.295591>. – DOI 10.1117/12.295591 (Zitiert auf Seite 77.)
- [182] STRAND, Jarle ; TAXT, Torfinn ; JAIN, Anil K.: Two-dimensional phase unwrapping using a block least-squares method. In: *Image Processing, IEEE Transactions on* 8 (1999), Nr. 3, S. 375–386 (Zitiert auf den Seiten 6, 48, 49, 53 und 78.)
- [183] STROHMER, Thomas ; VERSHYNIN, Roman: A randomized Kaczmarz algorithm with exponential convergence. In: *Journal of Fourier Analysis and Applications* 15 (2009), Nr. 2, S. 262–278 (Zitiert auf Seite 16.)
- [184] SWOGER, Jim ; PAMPALONI, Francesco ; STELZER, Ernst H.: Imaging cellular spheroids with a single (selective) plane illumination microscope. In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2014 (2014), Nr. 1, S. pdb–proto80176 (Zitiert auf Seite 19.)
- [185] TAKEDA, Mitsuo ; INA, Hideki ; KOBAYASHI, Seiji: Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry. In: *JosA* 72 (1982), Nr. 1, S. 156–160 (Zitiert auf den Seiten 42 und 44.)
- [186] THOMAS, Adrian M. K. ; BANERJEE, Arpan K.: *The History of Radiology*. Oxford University Press, 2013. – ISBN 0199639973 (Zitiert auf Seite 1.)

- [187] TOFT, Peter A. ; SØRENSEN, John A.: *The Radon transform-theory and implementation*, Technical University of Denmark Danmarks Tekniske Universitet, Department of Informatics and Mathematical Modeling Institut for Informatik og Matematisk Modellering, Diss., 1996 (Zitiert auf den Seiten 13, 14, 15, 16, 26, 28, 29 und 91.)
- [188] TRIBOLET, José: A new phase unwrapping algorithm. In: *IEEE Transactions on Acoustics Speech and Signal Processing* 25 (1977), Nr. 2, S. 170–177 (Zitiert auf Seite 6.)
- [189] TUCHIN, Valery V.: Optical clearing of tissues and blood using the immersion method. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 38 (2005), Nr. 15, S. 2497 (Zitiert auf den Seiten 2 und 4.)
- [190] VAKOC, Benjamin J. ; FUKUMURA, Dai ; JAIN, Rakesh K. ; BOUMA, Brett E.: Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential. In: *Nature Reviews Cancer* 12 (2012), Nr. 5, S. 363–368 (Zitiert auf Seite 1.)
- [191] VEST, Charles M.: Tomography for properties of materials that bend rays: a tutorial. In: *Applied optics* 24 (1985), Nr. 23, S. 4089–4094 (Zitiert auf Seite 92.)
- [192] WANG, Ge ; JIANG, Ming: Ordered-subset simultaneous algebraic reconstruction techniques (OS-SART). In: *Journal of X-ray Science and Technology* 12 (2004), Nr. 3, S. 169–178 (Zitiert auf Seite 16.)
- [193] WANG, Zhuo ; MILLET, Larry ; MIR, Mustafa ; DING, Huafeng ; UNARUNOTAI, Sakulsuk ; ROGERS, John ; GILLETTE, Martha U. ; POPESCU, Gabriel: Spatial light interference microscopy (SLIM). In: *Optics express* 19 (2011), Nr. 2, S. 1016–1026 (Zitiert auf Seite 42.)
- [194] WILKENS, Martin: *Eikonal - Mathematische Bissen zu Kursvorlesung Theoretische Physik*. <http://www.quantum.physik.uni-potsdam.de/teaching/ss2014/qm1/Eikonal.pdf>. Version: 2010. – Zugriff am 12.9.2015 (Zitiert auf Seite 12.)
- [195] XIONG, Ranhua ; RAEMDONCK, Koen ; PEYNSHAERT, Karen ; LENTACKER, Ine ; DE COCK, Ine ; DEMEESTER, Jo ; DE SMEDT, Stefaan C. ; SKIRTACH, Andre G. ; BRAECKMANS, Kevin: Comparison of gold nanoparticle mediated photoporation: vapor nanobubbles outperform direct heating for delivering macromolecules in live cells. In: *ACS nano* 8 (2014), Nr. 6, S. 6288–6296 (Zitiert auf Seite 93.)
- [196] YAMAGUCHI, Ichirou ; ZHANG, Tong: Phase-shifting digital holography. In: *Optics letters* 22 (1997), Nr. 16, S. 1268–1270 (Zitiert auf Seite 42.)
- [197] YU, Hengyong ; WANG, Ge: Compressed sensing based interior tomography. In: *Physics in medicine and biology* 54 (2009), Nr. 9, S. 2791 (Zitiert auf den Seiten 16 und 29.)

- [198] ZAPPA, Emanuele ; BUSCA, G: Comparison of eight unwrapping algorithms applied to Fourier-transform profilometry. In: *Optics and Lasers in Engineering* 46 (2008), Nr. 2, S. 106–116 (Zitiert auf Seite 48.)
- [199] ZEBKER, Howard A. ; LU, Yanping: Phase unwrapping algorithms for radar interferometry: residue-cut, least-squares, and synthesis algorithms. In: *JOSA A* 15 (1998), Nr. 3, S. 586–598 (Zitiert auf Seite 48.)
- [200] ZHAO, Ming ; ZHOU, Weibin ; PENG, Leilei: Parallel Multi-Color Fluorescence Lifetime Tomography in Deep Tissue. In: *Bio-Optics: Design and Application* Optical Society of America, 2013, S. BM4A-4 (Zitiert auf Seite 2.)
- [201] ZHAO, Zixin ; ZHAO, Hong ; ZHANG, Lu ; GAO, Fen ; QIN, Yuwei ; DU, Hubing: 2D phase unwrapping algorithm for interferometric applications based on derivative Zernike polynomial fitting technique. In: *Measurement Science and Technology* 26 (2015), Nr. 1, S. 017001 (Zitiert auf Seite 51.)
- [202] ZHONG, Heping ; TANG, Jinsong ; LIU, Dandan: A fast phase unwrapping algorithm based on minimum discontinuity by blocking. In: *Future Computer and Communication (ICFCC), 2010 2nd International Conference on* Bd. 1 IEEE, 2010, S. V1-717 (Zitiert auf den Seiten 48 und 49.)
- [203] ZIPFEL, Warren R. ; WILLIAMS, Rebecca M. ; WEBB, Watt W.: Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. In: *Nature biotechnology* 21 (2003), Nr. 11, S. 1369–1377 (Zitiert auf Seite 1.)
- [204] ZWEIGERDT, Robert ; OLMER, Ruth ; SINGH, Harmeet ; HAVERICH, Axel ; MARTIN, Ulrich: Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. In: *Nature protocols* 6 (2011), Nr. 5, S. 689–700 (Zitiert auf den Seiten 4 und 31.)

VERÖFFENTLICHUNGEN

ARTIKEL IN FACHZEITSCHRIFTEN

Antonopoulos, Georgios C.; STELTNER, Benjamin; HEISTERKAMP, Alexander; RIPKEN, Tammo; MEYER, Heiko: Tile-Based Two-Dimensional Phase Unwrapping for Digital Holography Using a Modular Framework. In: *PLoS ONE* 10 (2015), Nr. 11, e0143186.

KALIES, Stefan★; **Antonopoulos**, Georgios C.★; Rakoski, Mirko S.; Heinemann, Dag; Schomaker, Markus; Ripken, Tammo; Meyer, Heiko: Investigation of Biophysical Mechanisms in Gold Nanoparticle Mediated Laser Manipulation of Cells Using a Multimodal Holographic and Fluorescence Imaging Setup. In: *PLoS ONE* 10 (2015), Nr. 4, e0124052. [★ geteilte Erstautorenschaft].

Antonopoulos, Georgios C.; PSCHENIZA, Dimitri; LORBEER, Raoul-Amadeus; HEIDRICH, Marko; SCHWANKE, Kristin; ZWEIGERDT, Robert; RIPKEN, Tammo; MEYER, Heiko: Correction of image artifacts caused by refractive cylindrical surfaces in Scanning Laser Optical Tomography. In: *Biomedical Engineering – Biomedizinische Technik* 59 (2014), S. S514–S517.

BEGANDT, Daniela; BADER, Almke; **Antonopoulos**, Georgios C.; SCHOMAKER, Markus; KALIES, Stefan; MEYER, Heiko; RIPKEN, Tammo; NGEZAHAYO, Anaclet: Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: a new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 47 (2015), Nr. 5, S. 441–449.

BOER, Ulrike; BUETTNER, Falk F.; KLINGENBERG, Melanie; **Antonopoulos**, Georgios C.; MEYER, Heiko; HAVERICH, Axel; WILHELMI, Mathias: Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI. In: *PLoS ONE* 9 (2014), Nr. 8, e105964.

KALIES, Stefan; KEIL, Sebastian; SENDER, Sina; HAMMER, Susanne C.; **Antonopoulos**, Georgios C.; SCHOMAKER, Markus; RIPKEN, Tammo; ESCOBAR, Hugo M.; MEYER, Heiko; HEINEMANN, Dag: Characterization of the cellular response triggered by gold nanoparticle-mediated laser manipulation. In: *Journal of Biomedical Optics* 20 (2015), Nr. 11, S. 115005–115005.

KELLNER, Manuela; WEHLING, Judith; WARNECKE, Gregor; HEIDRICH, Marko; IZYKOWSKI, Nicole; VOGEL-CLAUSSEN, Jens; LORBEER, Raoul-Amadeus; **Antonopoulos**, Georgios; JANCIAUSKIENE, Sabina; GROTHAUSMANN, Roman; KNUDSEN, Lars; RIPKEN, Tammo; MEYER, Heiko; KREIPE, Hans; OCHS, Matthias; JONIGK, Danny; KÜHNEL Mark P.: Correlating 3D morphology with molecular pathology: fibrotic remodelling in human lung biopsies. In: *Thorax* 70 (2015), Nr. 12, S. 1197–1198.

LORBEER, Raoul-Amadeus; HITZEMANN, Moritz; HEIDRICH, Marko; **Antonopoulos**, Georgios; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Single shot telecentricity measurement by Fourier space grid separation. In: *Optics Express* 23 (2015), Nr. 5, S. 6613–6625.

ARTIKEL IN KONFERENZBÄNDEN

Antonopoulos, Georgios C.; RAKOSKI, Mirko; KALIES, Stefan; RIPKEN, Tammo; MEYER, Heiko; Experimental setup combining digital holographic microscopy (DHM) and fluorescence imaging to study gold nanoparticle mediated laser manipulation. In: *SPIE BiOS*, 2015, 93360G–93360G.

Antonopoulos, Georgios C.; PSCHENIZA, Dimitri; LORBEER, Raoul-Amadeus; HEIDRICH, Marko; SCHWANKE, Kristin; ZWEIGERDT, Robert; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Correction of image artifacts caused by refractive index gradients in scanning laser optical tomography. In: *SPIE BiOS International Society for Optics and Photonics*, 2014, S. 894907–894907.

KALIES, Stefan; GENTEMANN, Lara; **Antonopoulos**, Georgios; RAKOSKI, Mirko; HEINEMANN, Dag; SCHOMAKER, Markus; RIPKEN, Tammo; MEYER, Heiko; Experimental setup combining digital holographic microscopy (DHM) and fluorescence imaging to study gold nanoparticle mediated laser manipulation. In: *SPIE LASE*, 2015, 93550E–93550E.

MEYER, Heiko; **Antonopoulos**, Georgios C.; HEIDRICH, Marko; LORBEER, Raoul-Amadeus; KELLNER, Manuela; WINKEL, Andreas; STIESCH, Meike; KÜHNEL, Mark P.; OCHS, Matthias; RIPKEN, Tammo: Scanning Laser Optical Tomography: A highly efficient volumetric imaging technique for mesoscopic specimens. In: *European Conference on Biomedical Optics Optical Society of America*, 2013, 879706.

VORTRÄGE AUF KONFERENZEN

Antonopoulos, Georgios C.; RAKOSKI, Mirko; KALIES, Stefan; RIPKEN, Tammo; MEYER, Heiko; Experimental setup combining digital holographic microscopy (DHM) and fluorescence imaging to study gold nanoparticle mediated laser manipulation. In: *SPIE BiOS*, 9336-15 QPI Methodologies I, San Francisco, 7. Februar 2015.

Antonopoulos, Georgios C.; PSCHENIZA, Dimitri; LORBEER, Raoul-Amadeus; HEIDRICH, Marko; SCHWANKE, Kristin; ZWEIGERDT, Robert; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Correction of image artifacts caused by refractive cylindrical surfaces in Scanning Laser Optical Tomography. In: *BMT 2014*, Track I – Imaging and Image Processing: Image Analysis and processing (2), Hannover, 9. Oktober 2014.

Antonopoulos, Georgios C.; PSCHENIZA, Dimitri; LORBEER, Raoul-Amadeus; HEIDRICH, Marko; SCHWANKE, Kristin; ZWEIGERDT, Robert; RIPKEN, Tammo ; MEYER, Heiko: Correction of image artifacts caused by refractive index gradients in scanning laser optical tomography. In: *SPIE BiOS*, 8949-6 Computational and Compressive Imaging I, San Francisco, 4. Februar 2014.

MEYER, Heiko; **Antonopoulos**, Georgios C.★; HEIDRICH, Marko; LORBEER, Raoul-Amadeus; KELLNER, Manuela; WINKEL, Andreas; STIESCH, Meike; KÜHNEL, Mark P.; OCHS, Matthias; RIPKEN, Tammo: Scanning Laser Optical Tomography: A highly efficient volumetric imaging technique for mesoscopic specimens. In: *European Conference on Biomedical Optics*, EW2C.3 Fluorescence I, München, 15. Mai 2013. [★ Verfasser und Sprecher des Vortrags].

Anmerkung: Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht und ist in der Liste der Publikationen enthalten.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Georgios Christian Antonopoulos
Geburtsdatum	7. März 1985
Geburtsort	Emden
Eltern	Gabriele Walch-Antonopoulos (geb. Walch) Konstantinos Antonopoulos
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 02/2012	Laser Zentrum Hannover e.V. <i>Wissenschaftlicher Mitarbeiter</i> Abteilung Biomedizinische Optik Gruppe Biophotonische Bildgebung und Manipulation
05/2011 – 11/2011	CREOL: The College of Optics and Photonics <i>Visiting Graduate Student</i> Arbeitsgruppe Laser Plasma Lab
02/2011 – 04/2011	Fraunhofer Institut für Lasertechnik <i>Wissenschaftliche Hilfskraft</i>
09/2009 – 01/2011	Fraunhofer Institut für Lasertechnik <i>Studentische Hilfskraft</i>
04/2008 – 09/2008	Fraunhofer Institut für Lasertechnik <i>Studentische Hilfskraft</i> Abteilung Oberflächentechnik, Kompetenzfeld Generative Laserverfahren und funktionale Schichten
01/2008 – 03/2008	Fraunhofer Institut für Lasertechnik <i>Praktikant</i> Abteilung Modellierung und Simulation

AUSBILDUNG

04/2005 – 02/2011	RWTH Aachen Studium der Physik Abschluss als Diplom-Physiker
09/2007 – 12/2007	University of Surrey Auslandsstudium im Rahmen des Erasmus-Programms der Europäischen Union
06/2004	Gymnasium Carolinum Osnabrück Erwerb des Abiturs



och sind sie gleich bereit, zu weinen und zu lachen,
Sie ehren noch den Schwung, erfreuen sich am Schein;
Wer fertig ist, dem ist nichts recht zu machen;
Ein werdender wird immer dankbar sein.

— JOHANN WOLFGANG VON GOETHE, *Faust. Eine Tragödie*

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne das Zutun einer Menge Menschen, bei denen ich mich im Folgenden bedanken möchte.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Alexander Heisterkamp bedanken, der mich mit seinem Fachwissen unterstützt hat und diese Dissertation mit seinen konstruktiven Anregungen zu einer besseren Arbeit gemacht hat. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Holger Lubatschowski, der sich die Zeit genommen hat, diese Arbeit sorgfältig zu begutachten und zu verbessern. Ein spezieller Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Ertmer, der die fachliche Betreuung dieser Arbeit während der Abwesenheit von Prof. Dr. Heisterkamp übernommen hat und mir während dieser Zeit mit fachlichem Rat zur Seite stand. Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Peter Maaß, der sich die Zeit nahm mir die Feinheiten der Mathematik der tomographischen Rekonstruktion darzulegen und Jahre später die Zeit gefunden hat, diese Arbeit nochmals zu begutachten.

Besonderen Dank möchte ich meinem Abteilungsleiter Dr. Tammo Ripken und meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Heiko Meyer aussprechen. Ohne ihr ehrliches Interesse an meiner Arbeit, ihre fachlichen Eingaben und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten hätte dieses Projekt nicht stattfinden können.

Weiterhin möchte ich Dr. Robert Zweigerdt, Dr. Kristin Schwanke und Dimitrij Pscheniza meinen Dank aussprechen für die Präparation und Überlassung der Zellaggregate sowie die gute Zusammenarbeit im BMBF Projekt TOMOSphäre.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei einigen Menschen bedanken, ohne deren Zusammenarbeit diese Arbeit sicherlich nicht so positiv verlaufen wäre. Da ist zunächst Stefan Kalies, mit dem ich eine Menge Feierabende im Labor verbrachte, bis wir einen Vorversuch realisieren konnten, der den Grundstein für die Ergebnisse aus Kapitel 5 gelegt hat. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Mirko Rakoski bedanken, der später als Student dazugestoßen ist und im Rahmen seiner Masterarbeit viel zu den erfolgreichen Experimenten beigetragen hat. Außerdem möchte ich Benjamin Steltner meinen großen Dank

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Hannover, den 13. Juli 2016

Dipl.-Phys. Georgios
Christian Antonopoulos

COLOPHON

This document was typeset using the typographical look-and-feel `classicthesis` developed by André Miede. The style was inspired by Robert Bringhurst's seminal book on typography "*The Elements of Typographic Style*". `classicthesis` is available for both \LaTeX and \LyX :

<http://code.google.com/p/classicthesis/>

Happy users of `classicthesis` usually send a real postcard to the author, a collection of postcards received so far is featured at:

<http://postcards.miede.de/>

Final Version as of 13. Juli 2016 (`classicthesis` version 1.0).