

# Entwicklung eines Kalibrierphantoms für die optische Bildgebung am Rattenkopf

Diplomarbeit

im Fachbereich Photoingenieurwesen und Medientechnik  
an der Fachhochschule Köln

Autor

Julia Scholzen

aus Bonn

Mat-Nr. 11036637

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Blendl, FH Köln

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Hoehn, Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln

Köln, Dezember 2006

# Development of a calibration phantom for the optical imaging of the rat hat

Thesis

at the Departement of  
Imaging Sciences and Media Technology  
University of Applied Sciences Cologne

Author

Julia Scholzen

from Bonn

Mat-Nr. 11036637

First Reviewer: Prof. Dr. rer. nat. Blendl, FH Köln

Second Reviewer: Prof. Dr. rer. nat. Hoehn, Max-Planck-Institute for neurological research

Cologne, December 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
2.1	Optische Konstanten.....	3
2.2	Strahlungstransporttheorie.....	5
2.3	Messung von optischen Gewebeeigenschaften .....	7
2.4	Optische Eigenschaften des Rattenhirns.....	8
2.5	Phantome für die optische Bildgebung.....	10
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
3.1	Aufbau des Kalibrierphantoms.....	12
3.2	Photometrische Messgeräte .....	14
3.2.1	UV-2100PC .....	14
3.2.2	Monolithic Miniature Spektrometer (MMS).....	15
3.2.3	NightOWL LC981 .....	16
3.3	Phantomeinheit .....	18
3.3.1	Basismaterial .....	18
3.3.2	Absorber .....	20
3.3.3	Streumedium.....	20
3.3.4	Phantome .....	21
3.4	Kalibriereinheit.....	22
3.4.1	Biolumineszierende Stammzellen .....	22
3.4.2	Lichtquelle .....	23
3.4.3	Implementierung in die Phantomeinheit.....	24
3.4.4	Filter .....	25
3.4.5	Strom- und Temperaturkonstanz .....	27
3.4.6	Glowell-Standard.....	28

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
4.1	Phantomeinheit .....	29
4.2	Kalibriereinheit .....	37
4.2.1	NightOWL LC981 .....	37
4.2.2	Spektrum der Lichtquelle .....	39
4.2.3	Abstrahlcharakteristik des Diffusors .....	41
4.2.4	Strom- und Temperaturkonstanz .....	42
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>44</b>
5.1	Bewertung der Ergebnisse .....	44
5.2	Ausblick.....	47
5.3	Fazit .....	48
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>49</b>
<b>A</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>54</b>
A.1	Rohdaten.....	54
A.2	Eidesstattliche Erklärung.....	55
A.3	Danksagung .....	56

## Kurzbildbeschreibung

**Titel:** Entwicklung eines Kalibrierphantoms für die optische Bildgebung am Rattenkopf

**Autor:** Scholzen, Julia

**Referenten:** Prof. Dr. rer. nat. Blendl, Prof. Dr. rer. nat. Hoehn

**Zusammenfassung:**

In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines Kalibrierphantoms beschrieben, das die optischen Eigenschaften des Rattenhirns widerspiegelt und die Kalibration einer hochempfindlichen CCD-Kamera ermöglicht. Als Lichtquelle diente eine LED, deren Intensität mit Hilfe einer Referenzspannungsquelle und eines Temperaturkontrollsystem mit einer Genauigkeit von 2 ‰ eingestellt werden konnte.

**Stichwörter:**

Gewebephantom, Optische Bildgebung, Biolumineszenz, Kalibrierung

**Datum:** 18. 12. 2006

**Title:** Development of a calibration phantom for the optical imaging of the rat hat

**Author:** Scholzen, Julia

**Advisores:** Prof. Dr. rer. nat. Blendl, Prof. Dr. rer. nat. Hoehn

**Abstract:** This thesis describes the development of a calibration phantom that simulates the optical properties of the rat brain and gives the occasion to calibrate a highly sensitive CCD-camera. For the light source an LED was used. With a temperature control system and a precision voltage reference the intensity of the LED could be adjusted with the accuracy of 2 ‰.

**Key words:** Tissue like phantom, Optical Imaging, Bioluminescence, Calibration

**Date:** 18. 12. 2006

# 1 Einleitung

1895 legte Röntgen mit der Entdeckung der X-Rays den Grundstein für die medizinische Bildgebung. Innerhalb von kürzester Zeit hielten Röntgenstrahler Einzug in die Diagnostik von Krankheiten, ohne dass die Nebenwirkungen der Röntgenstrahlen bekannt waren. Heute weiß man um die Schäden, die von Röntgenstrahlen verursacht werden, und versucht, die Strahlendosis gering zu halten. Gleichzeitig wird die Entwicklung neuer, nicht-invasiver Bildgebungsverfahren ständig vorangetrieben. Neben der Magnetresonanztomographie, der Positronen-Emissions-Tomographie und der Sonographie stehen zu diesem Zweck auch optische Methoden zur Verfügung. Beispielsweise könnte die optische Tomographie künftig zur Detektion von Tumoren oder die Nahinfrarotspektroskopie zu funktionellen Untersuchungen des Gehirns dienen. Eine Möglichkeit der optischen Bildgebung auf zellulärer Ebene besteht darin, einer Zelle das Luziferase-Gen eines biolumineszierenden Organismus zu übertragen. Dieses veranlasst die Zelle, das Enzym Luziferase zu synthetisieren. Reagiert dieses Enzym mit einem oxidierbaren Substrat (Luziferin), so wird Licht emittiert. Eine Besonderheit stellen die Luziferine der Leuchtkäfer dar, da diese vor der Oxidation mit Adenosintriphosphat (ATP) reagieren müssen. Die ATP-Abhängigkeit der Enzymreaktion gibt Auskunft über den energetischen Zustand einer Zelle. Seit Kurzem findet die Biolumineszenz Anwendung in der Stammzellforschung. Stammzellen sind Zellen, die sich zu beliebigen anderen Gewebezellen ausdifferenzieren können. Wegen ihrer Fähigkeit sich unbegrenzt zu vermehren erhofft man sich, mit ihnen eine unerschöpfliche Quelle von Zell- und Gewebeersatz gefunden zu haben. Dies ist vor allem interessant bei Geweben, die kein oder nur ein geringes Regenerationsvermögen aufweisen (z.B. Nervengewebe). Nach einem Schlaganfall könnte eine Stammzell-Therapie eine Möglichkeit zur Regeneration des geschädigten Hirngewebes bieten. Dazu würden nach einem Schlaganfall Stammzellen in das Gehirn implantiert. Zur Regeneration müssen die Stammzellen in den geschädigten Hirnbereich migrieren und dort zu Neuronen ausdifferenzieren. Ob und unter welchen

Bedingungen sie dies tun, wird in der aktuellen Forschung am Tiermodell mit Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*, Wistar-Stamm) untersucht.

Vor der Implantation in das Rattenhirn werden die Stammzellen mit einem Luziferase-Gen transfiziert. Nach Injektion einer Luziferin-Lösung lassen sich sowohl die Migration als auch der energetische Zustand der Stammzellen anhand der emittierten Lichtmenge beobachten. Bei der Ausbreitung im Rattenkopf wird die Intensität des Lichts durch Absorptions- und Streuprozesse abgeschwächt. Der Grad der Abschwächung steigt exponentiell mit der Tiefe der Zellen im Gewebe an. Die auf einen Detektor auftreffende Intensität ist sowohl von der Anzahl lichtemittierender Zellen als auch von der Tiefe der Zellen im Gewebe abhängig. Um aus der gemessenen Intensität auf die Anzahl bzw. den energetischen Zustand der Stammzellen rückschließen zu können, müssen daher zunächst die Tiefe der Zellen im Gewebe sowie dessen optischen Eigenschaften bestimmt werden.

Das mit einer CCD-Kamera gemessene Signal stellt eine zweidimensionale Projektion der Zellen im Rattenkopf dar. Eine Möglichkeit, die Tiefeninformation aus einer solchen Aufnahme zu erhalten, bietet die spektrale Auflösung des Biolumineszenzsignals. Hierzu werden Messungen bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt. Dabei wird ausgenutzt, dass Photonen verschiedener Wellenlänge unterschiedlich stark abgeschwächt werden. Die Gewinnung der Tiefeninformation durch Aufnahme des Rattenkopfes in verschiedenen Winkeln erfordert eine aufwendigere Apparatur und Bildrekonstruktion. Zwar gibt es schon erste Ansätze für solche bildgebenden Systeme (z.B. Xenogen Ivis Imaging System 3D Series), diese befinden sich jedoch noch im Entwicklungsstadium.

Da das vom Rattenkopf transmittierte Licht eine sehr geringe Intensität aufweist, werden zur Detektion dieses Lichts hochempfindliche CCD-Kameras eingesetzt, die im Extremfall einzelne Photonen detektieren können. Um eine solche Aufnahme messtechnisch auswerten zu können, ist es notwendig, die CCD-Kamera zu kalibrieren. Das Kalibrieren einer Photonen zählenden Kamera erfordert eine Lichtquelle mit geringer und sehr konstanter Intensität.

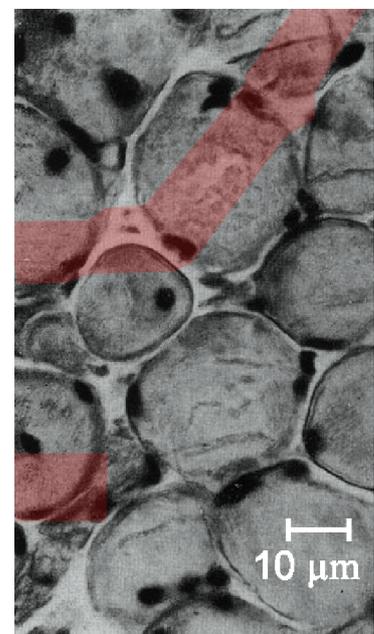
Ziel dieser Arbeit war es, ein Kalibrier-Phantom zu entwickeln, das die optischen Eigenschaften des Rattenhirns und der biolumineszierenden Stammzellen annähernd widerspiegelt. Mit diesem Phantom sollen später die Einflüsse der Dicke des abschwächenden Materials und der Intensität der Lichtquelle auf das Signal untersucht werden können. Die Lichtquelle des Phantoms soll sich zum Kalibrieren einer CCD-Kamera eignen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Optische Konstanten

Eine zuverlässige Lokalisation der lumineszierenden Zellen im Rattenhirn anhand der transmittierten Lichtverteilung setzt Kenntnisse über die Lichtausbreitung in biologischem Gewebe und über dessen optische Eigenschaften voraus. Im Folgenden wird daher zunächst auf die optischen Gewebeeigenschaften eingegangen, um dann die Theorie der Lichtausbreitung in biologischem Gewebe zu erläutern.

Die Wechselwirkung von Licht mit biologischem Gewebe wird durch Absorptions- und Streuprozesse bestimmt. Bei einem Absorptionsvorgang gibt ein Photon seine gesamte Energie an ein Chromophor im Gewebe ab. Im sichtbaren Bereich werden Photonen vor allem von Hämoglobin absorbiert. Andere Gewebebestandteile wie Wasser, Proteine und Lipide absorbieren Licht vor allem im ultravioletten und nahinfraroten Bereich. Zu Streuung kommt es, wenn Licht aufgrund von unterschiedlichen Brechungsindizes benachbarter Strukturen reflektiert oder gebeugt wird. Solche Unterschiede im Brechungsindex finden sich in biologischem Gewebe an zahlreichen mikroskopischen Strukturen wie Zellmembranen, Zellkernen und Mitochondrien. Daher können Photonen in biologischem Gewebe mehrfach gestreut werden, bevor sie absorbiert werden oder das Gewebe wieder verlassen.



**Abbildung 1**  
Absorption und Streuung auf zellulärer Ebene

Um die Absorption und Streuung genauer zu beschreiben, werden der Absorptionskoeffizient  $\mu_a$  und der Streukoeffizient  $\mu_s$  definiert, welche die Wahrscheinlichkeit für einen Absorptions- bzw. Streuprozess angeben. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon eine Strecke  $l$  im Gewebe zurücklegt ohne absorbiert bzw. gestreut zu werden, sinkt exponentiell mit dem zurückgelegten Weg:

$$P_a(l) = e^{-\mu_a \cdot l} \quad (2.1)$$

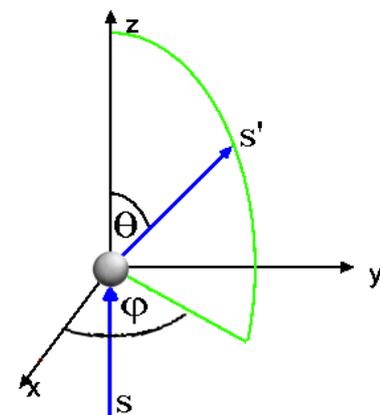
$$P_s(l) = e^{-\mu_s \cdot l} \quad (2.2)$$

Unter dem totalen Abschwächungskoeffizienten  $\mu_t$  versteht man die Summe aus Absorptions- und Streukoeffizient. Sowohl der Absorptions- als auch der Streukoeffizient sind abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts und vom Gewebetyp. Im Allgemeinen liegt der Streukoeffizient von biologischem Gewebe in einem um etwa zwei Größenordnungen höheren Bereich als der Absorptionskoeffizient.

Der Streukoeffizient gibt zwar Auskunft über die Wahrscheinlichkeit für ein Streueignis, er macht jedoch keine Angaben über die Richtung, in die gestreut wird. Daher wird die Phasenfunktion  $p(\vec{s}, \vec{s}')$  eingeführt, die die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der ein Photon aus der Richtung  $\vec{s}$  in die Richtung  $\vec{s}'$  gestreut wird. In homogenem Gewebe kann davon ausgegangen werden, dass die Phasenfunktion keine azimutale Abhängigkeit aufweist und lediglich vom Polarwinkel  $\theta$  abhängt. Von dieser Annahme ausgehend kann statt der Phasenfunktion der mittlere Kosinus  $g$  des Polar- oder Streuwinkels  $\theta$  angegeben werden:

$$g = \int_{4\pi} p(\cos \theta) \cos \theta d\Omega \quad (2.3)$$

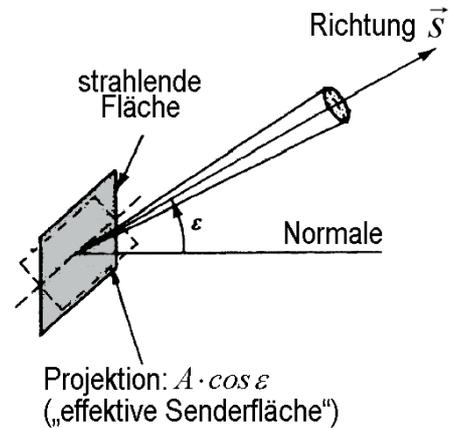
Entsprechend dieser Definition variiert der Wert von  $g$  zwischen 1 und -1. Dem Wert  $g = 0$  entspricht eine isotrope (richtungsunabhängige) Streuung, während  $g = -1$  reine Rückwärts- und  $g = 1$  reine Vorwärtsstreuung bedeuten. Daher wird diese Konstante auch als Anisotropiefaktor bezeichnet. Der Anisotropiefaktor von biologischem Gewebe liegt typischerweise zwischen 0,7 und 0,95 [3].



**Abbildung 2:**  
Streuung eines Photons aus der Richtung  $s$  in die Richtung  $s'$

## 2.2 Strahlungstransporttheorie

Die Lichtausbreitung in biologischem Gewebe lässt sich unter der Annahme einer homogenen Verteilung der Chromophore und Streuzentren im Gewebe und für eine einheitliche Streucharakteristik mit der Strahlungstransporttheorie beschreiben. Die fundamentale Gleichung dieser Theorie ist die Strahlungstransportgleichung, welche die durch Absorption und Streuung verursachte Änderung der Strahldichte  $L(r, \vec{s})$  beschreibt. Die Strahldichte ist dabei definiert als der Strahlungsfluss  $\Phi(r)$ , der den Punkt  $r$  einer Fläche in die Richtung  $\vec{s}$  pro Raumwinkelelement und pro in die Richtung  $\vec{s}$  projiziertem Flächenelement durchtritt (siehe auch Abbildung 3):



**Abbildung 3**  
Zur Definition der Strahldichte nach [26]

$$L(r, \vec{s}) = \frac{d^2 \Phi(r, \vec{s})}{d\Omega d(A \cdot \cos \varepsilon)} \quad (2.4)$$

Die zeitunabhängige Strahlungstransportgleichung lautet:

$$\vec{s} \cdot \nabla (\mu_a + \mu_s) L(r, \vec{s}) + \mu_s \int_{4\pi} p(\vec{s}, \vec{s}') L(r, \vec{s}') d\Omega' + S(r, \vec{s}) \quad (2.5)$$

Der erste Term der rechten Seite in Gleichung (2.5) beschreibt die Abschwächung durch Streu- und Absorptionsprozesse, der zweite Term beschreibt den Zunahme der Strahldichte durch in die Richtung  $\vec{s}$  zurückgestreutes Licht. Der Term  $S(r, \vec{s})$  wird als Quellterm bezeichnet und beschreibt das von der Lichtquelle eingekoppelte Licht.

Für den Spezialfall eines rein absorbierenden Mediums ( $\mu_s = 0$ ) ergibt sich aus der eindimensionalen Strahlungstransportgleichung ( $\vec{s} = (1, 0, 0)$ ) das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$\frac{d}{dx} L(x) = -\mu_a L(x) \quad \Rightarrow \quad L(x) = L(0) \cdot e^{-\mu_a x} \quad (2.6)$$

Für stark streuende biologische Medien ist diese Gleichung jedoch nicht gültig. In diesem Fall wird die Strahlungstransportgleichung häufig mit der Diffusionsapproximation gelöst. Dazu

werden die Strahldichte  $L(r, \vec{s})$ , die Phasenfunktion  $p(\vec{s}, \vec{s}')$  und der Quellterm nach Kugel­flächenfunktionen  $Y_{lm}(\theta, \varphi)$  entwickelt, von denen jeweils nur die ersten beiden Glieder in die Strahlungstransportgleichung eingesetzt werden. Unter der Diffusionsapproximation wird aus Gleichung (2.5) eine Diffusionsgleichung für den richtungsunabhängigen Strahlungsfluss  $\Phi(r)$  (genaue Beschreibung siehe [13, 17, 31]). Mit der Diffusionsgleichung lässt sich die Lichtausbreitung im Gewebe mit nur zwei statt drei optischen Konstanten beschreiben – dem Absorptionskoeffizient  $\mu_a$  und dem so genannten reduzierten Streukoeffizient:

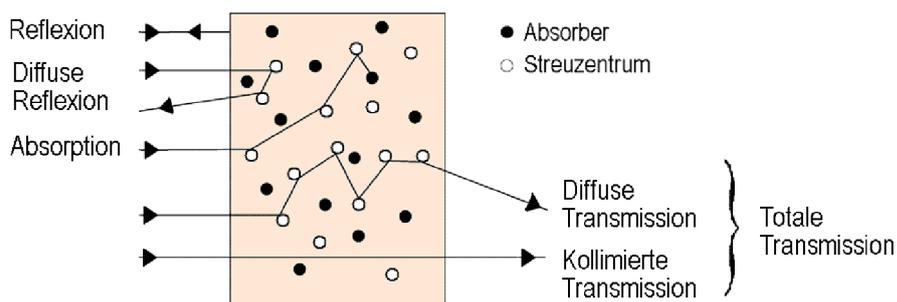
$$\mu'_s = \mu_s (1 - g) \quad (2.7)$$

Mit dem reduzierten Streukoeffizient werden die Streuwahrscheinlichkeit und –Charakteristik zu einem Parameter zusammengefasst. Dem entspricht die Annahme, dass ein großer Streukoeffizient bei starker Vorwärtsstreuung ( $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$  und  $g = 0,1$ , d.h.  $\mu'_s = 1 / \text{mm}$ ) und ein kleiner Streukoeffizient bei isotroper Streuung ( $\mu_s = 1 \text{ mm}^{-1}$  und  $g = 1$ , d.h.  $\mu'_s = 1 / \text{mm}$ ) dieselben Lichtverteilungen liefern. Eine solche Lichtverteilung ist erst nach mehreren Streueignissen gegeben. Yoo et al. geben als Gültigkeitskriterium einen minimalen Abstand von 10 Transportweglängen  $l / \mu'_s$  vom Eintrittspunkt der Strahlung in das Medium an [42]. Dem entsprechend versagt die Diffusionsapproximation in der Nähe des Einstrahlpunktes oder in dünnen Gewebeschichten.

Sind die Gültigkeitskriterien der Diffusionsapproximation nicht erfüllt, so kann die Strahlungstransportgleichung durch Verwendung einer Monte-Carlo Simulation gelöst werden. Dies ist ein stochastisches Programm, das den Weg einzelner Photonen durch ein Medium berechnet. So lassen sich für beliebige Geometrien, Strahlungsquellen und optische Parameter die zu erwartenden Transmissions- und Reflexionswerte vorhersagen. Die gewünschte Genauigkeit lässt sich über die Anzahl an Photonen, deren Weg berechnet wird, und damit auf Kosten langer Rechenzeiten erreichen. Um umgekehrt aus Transmissions- und Reflexionsmessungen die optischen Parameter zu bestimmen, wird die Monte-Carlo-Simulation invertiert. Eine inverse Monte-Carlo Simulation berechnet aus geschätzten optischen Parametern die zu erwartenden Transmissions- und Reflexionswerte und passt die Parameter entsprechend der Abweichung zwischen berechneten und tatsächlichen Werten an. Durch Austesten werden so in mehreren Durchläufen die optischen Parameter der Probe ermittelt.

## 2.3 Messung von optischen Gewebeeigenschaften

Zur Bestimmung von optischen Gewebeeigenschaften werden heute vor allem computerbasierte Verfahren eingesetzt. Es werden mindestens drei Messwerte zur Berechnung der drei optischen Parameter  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  und  $g$  benötigt. In der Regel sind dies die diffuse oder totale Reflexion, die diffuse oder totale Transmission und die kollimierte Transmission (Abbildung 4).



**Abbildung 4**  
Lichtausbreitung in einem streuenden Medium

Um die Reflexions- und Transmissionswerte einer Probe zu bestimmen, verwenden viele Forschungsgruppen ein Ulbrichtkugel-Spektrometer [10, 14, 24, 25, 33, 34, 37, 41]. Eine Ulbrichtkugel ist eine Hohlkugel, deren Innenwand mit einem nicht absorbierenden, aber stark diffus reflektierenden Material beschichtet ist. Ein geeignet positionierter Detektor kann das von einer Probe diffus reflektierte oder transmittierte Streulicht erfassen. Durch ein System aus Lochblenden vor und hinter der Probe sowie vor dem Detektor kann die kollimierte Transmission gemessen werden.

Ein grundlegendes Problem besteht darin, dass biologisches Gewebe äußerst inhomogen ist. Sowohl zwischen Individuen einer Art als auch innerhalb eines einzelnen Individuums können die optischen Eigenschaften eines einzigen Gewebetyps Schwankungen aufweisen. Zusätzlich hat auch der physiologische Zustand des Gewebes während der Messung einen Einfluss auf dessen optischen Eigenschaften. Die optischen Eigenschaften einer In-vitro-Messung weichen von den realen In-vivo-Eigenschaften ab, da die Absorption im sichtbaren Bereich vor allem durch das Hämoglobin bestimmt wird. Daneben werden der Absorptions- und der Streukoeffizient durch Präparationsmethoden wie Gefrieren der Gewebeprobe, Lagerdauer nach dem Todeseintritt, Einlegen in Salzlösung oder Pressen um bis zu 50% vergrößert oder verkleinert [28, 29]. Auch Mängel im Messaufbau und dem verwendeten Ansatz zur Lösung der Strahlungstransportgleichung verursachen falsche Ergebnisse.

## 2.4 Optische Eigenschaften des Rattenhirns

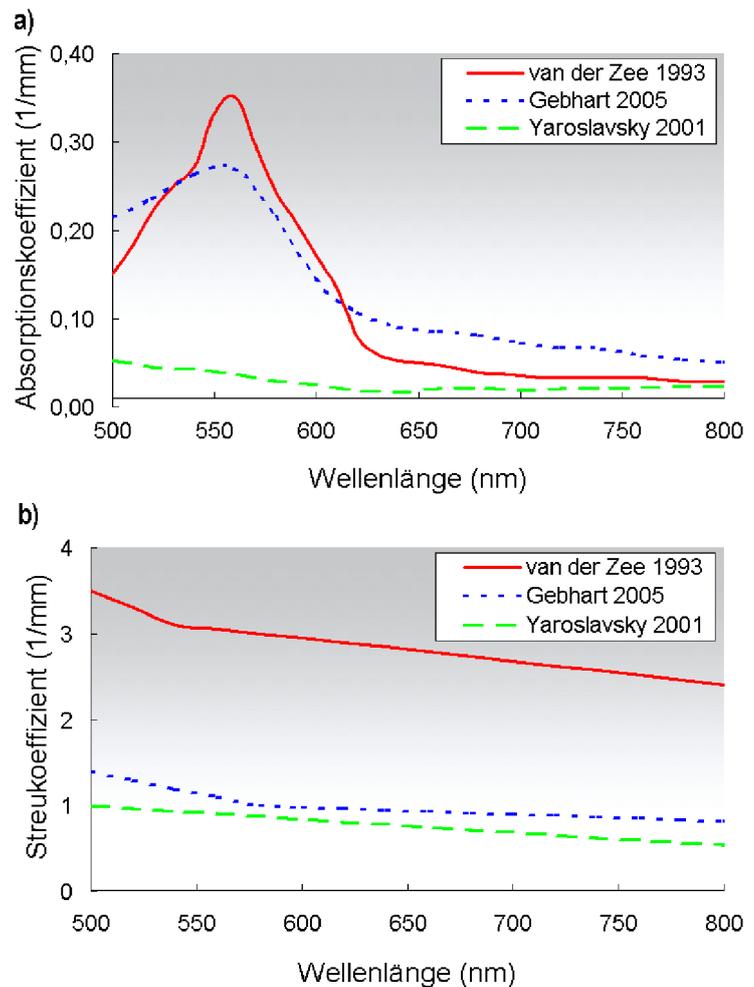
Die Vielzahl an Fehlerquellen bei der Bestimmung der optischen Parameter von biologischem Gewebe führt zu großen Schwankungen in den von verschiedenen Studien ermittelten Werten. Für ein einziges Gewebe finden sich in der Literatur Werte, die um bis zu zwei Größenordnungen voneinander abweichen [3]. Aufgrund dieser Tatsache hat sich bis heute kein Standardverfahren zur Ermittlung der optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe etablieren können. Für die Konstruktion eines Phantoms mit den optischen Eigenschaften des Rattenhirns werden Informationen über dessen Absorptions- und Streuverhalten im lebenden Tier benötigt. Wegen des Fehlens eines Standardverfahrens zur Ermittlung der optischen Eigenschaften von biologischen Geweben wird in der vorliegenden Arbeit auf Literaturwerte zurückgegriffen. Für die optischen Eigenschaften von Rattenhirn sind lediglich von van der Zee Werte veröffentlicht worden [36]. Diese Werte beziehen sich auf das Gehirn von Wistar-Ratten, die gleiche Art, die auch für die Schlaganfall-Forschung verwendet wird. Die Phasenfunktion wurde von van der Zee durch goniometrische Messungen bestimmt, die Absorptions- und Streukoeffizienten durch Messungen der diffusen Reflexion und Transmission mit einem Ulbrichtkugel-Spektrometer [36].

Da die Gewebeproben von van der Zee erst 24 Stunden post-mortem untersucht und zur Messung zwischen zwei Glasplättchen geklemmt wurden, stimmen die ermittelten optischen Parameter möglicherweise nicht mit den tatsächlichen In-vivo-Koeffizienten überein [36]. Zur Einschätzung der Werte wurden daher zusätzlich die an menschlicher grauer Hirnmasse ermittelten optischen Koeffizienten herangezogen, die denen des größtenteils aus grauer Hirnmasse bestehenden Rattenhirns ähneln sollen. Berücksichtigt wurden dabei nur solche Untersuchungen, bei denen die optischen Eigenschaften über einen breiten spektralen Bereich mit numerischen Methoden bestimmt wurden. Dies waren die Arbeit von Gebhart et al. [14] und die von Yaroslavsky et al. [41].

Bei einem Vergleich der Absorptionsspektren (Abbildung 5 a) sind die von Yaroslavsky et al. ermittelten Werte kritisch zu beurteilen, da vor der Messung gezielt das Blut aus den Gehirnen gewaschen wurde [41]. Sowohl das Absorptionsspektrum von Rattenhirn nach [36] als auch das von menschlicher grauer Hirnmasse nach [14] weisen jedoch einen stark von der Hämoglobinabsorption beeinflussten Verlauf auf. Von Gebhart et al. wurden allerdings die Gewebeproben vor der Messung in Salzlösung gelegt, wodurch vermutlich ein Teil des Bluts aus dem Gewebe gewaschen und der Absorptionskoeffizient leicht reduziert wurde [14].

Für das In-vivo-Absorptionsspektrum von Rattenhirn wird daher das von van der Zee gemessene Absorptionsspektrum angenommen.

Eine Betrachtung der Streuspektren (Abbildung 5 b) zeigt einen ähnlichen Verlauf des reduzierten Streukoeffizienten in allen drei Untersuchungen, jedoch weist das von van der Zee ermittelte Streuspektrum von Rattenhirn gegenüber den Spektren menschlicher grauer Hirnmasse erhöhte Werte auf. Vermutlich liegen die Streukoeffizienten der beiden Gewebearten jedoch im gleichen Bereich. Eine der Forschungsgruppen muss die Werte daher falsch berechnet haben. Ein Grund für eine Überschätzung des Streukoeffizienten von van der Zee kann in der von ihm verwendeten Monte-Carlo Simulation liegen. Bei Ulbrichtkugel-Messungen kommt es zu Lichtverlusten an den Öffnungen der Kugel. Werden diese Lichtverluste bei der Berechnung der Koeffizienten nicht berücksichtigt, so werden diese überschätzt. Die Monte-Carlo-Simulation von van der Zee bedachte diese Lichtverluste anders als neuere Simulationen nicht. Daher wird im Folgenden für das In-vivo-Streuspektrum von Rattenhirn nicht das von van der Zee sondern das von Gebhart et al. ermittelte Spektrum angenommen.



**Abbildung 5**

Vergleich des Absorption- (a) und Streuspektrums (b) von Rattenhirn [36] mit dem von menschlicher grauer Hirnmasse [14, 41]. Die Daten wurden aus den Abbildungen in den Artikeln rekonstruiert.

## 2.5 Phantome für die optische Bildgebung

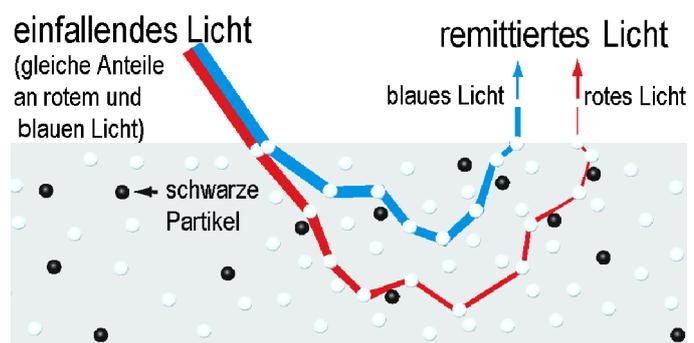
Die Beschreibung der Lichtausbreitung wird im Fall der Biolumineszenz-Bildgebung komplizierter, da Vitalität und damit die Intensität des emittierten Lichts sowie Verteilung und Ort der biolumineszierenden Zellen im Gewebe nicht bekannt sind. Rekonstruktionsalgorithmen, die diese Informationen mithilfe der Strahlungstransportgleichung berechnen, befinden sich zurzeit noch in der Entwicklung [2, 15]. Gerade im Gehirn, das größtenteils vom Schädelknochen umschlossen wird, liefern diese Algorithmen bisher keine befriedigenden Ergebnisse. Daher wird ein Phantom des Rattenkopfes mit bekannten optischen Eigenschaften benötigt, an dem der Zusammenhang zwischen Ort und Helligkeit der Lichtquelle systematisch untersucht werden kann.

In den meisten Fällen wird für den Bau eines solchen Phantoms ein klares Basismaterial verwendet, dem absorbierende und streuende Medien zugefügt werden. Da der Streukoeffizient wellenlängenabhängig

ist, wird Licht verschiedener Wellenlängen unterschiedlich häufig gestreut. Häufiger gestreutes Licht hat einen längeren Weg im Medium und daher auch eine höhere Wahrscheinlichkeit, absorbiert zu werden. Hinzu kommt, dass die meisten Materialien weder reine Absorber noch reine Streumaterialien sind. Eine

genaue Einstellung der optischen Eigenschaften eines Phantoms wird dadurch erschwert.

Die einfachste Variante zur Herstellung optischer Gewebephantome ist das Einbringen von Streu- und Absorptionsmedien in eine wässrige Lösung. Als Absorber können Tinte [2, 20, 32], Farbstoffe [22] oder Blut [6] dienen, als Streumedium wird Milch [1] oder Intralipid [2, 7, 12, 38] beigemischt. Bei Intralipid handelt es sich um eine Fettlösung, die normalerweise zur intravenösen Ernährung verwendet wird. Der größte Nachteil dieser Phantome ist, dass ihre optischen Eigenschaften nur über eine kurze Zeit stabil sind. Zusätzlich wird eine genaue Einstellung der optischen Koeffizienten dadurch erschwert, dass die optischen Eigenschaften von Intralipid und Milch je nach Herstellungsart variieren können.



**Abbildung 6**  
Einfluss der Streuung auf die Absorption am Beispiel eines Mediums, das rotes Licht stärker als blaues Licht streut (nach [9]). Die Absorption bei beiden Wellenlängen ist gleich groß.

Um feste Phantome zu erhalten, wird die Lösung in manchen Fällen mit Agar versetzt [4, 39]. Agar-Phantome neigen allerdings zu Schrumpfung und müssen ständig feucht gehalten werden, da eine Änderung des Feuchtigkeitsgehalts sich auf die optischen Eigenschaften auswirkt.

Seit Kurzem wird auch Wachs als Basismaterial für Gewebephantome verwendet [27, 30]. Als Streumedium dienen weiße, als Absorber beliebige andere Pigmente.

Lange Haltbarkeit und stabile optische Eigenschaften erzielt man jedoch am besten mit Phantomen auf Harzbasis. Als Basismaterialien haben sich Epoxid- und Polyesterharze etabliert [11, 16, 18, 19, 21, 34]. Diese Harze sind zunächst flüssig und härten nach Zugabe eines Härters aus. Als Absorber können dem Harz vor dem Aushärten hitzebeständige Farbstoffe beigemischt werden, die bei der exothermischen Reaktion von Harz und Härter nicht zerfallen. Als Streumedium wird in den meisten Fällen Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) [16, 18, 19] verwendet. Titandioxid kommt in verschiedenen Kristallstrukturen vor, wobei die Rutil-Modifikation die stabilste ist. Wegen seines hohen Brechungsindex ( $n_{\text{Rutil}} = 2,75$ ), der sogar höher als der von Diamant ( $n_{\text{Diamant}} = 2,42$ ) ist, findet  $\text{TiO}_2$  vor allem Verwendung als Weißpigment in Farben und Lacken. Der Streukoeffizient wird von der Größe und dem Brechungsindex der  $\text{TiO}_2$ -Kristallite und des umgebenden Mediums bestimmt. In biologischem Gewebe findet Streuung an einer Vielzahl von Strukturen statt, die sich hinsichtlich ihrer Form, Größe und ihres Brechungsindex unterscheiden. Dies wird beim Phantombau durch die Verwendung eines Streumediums mit festem Brechungsindex und geringer Variation in Form und Größe nur näherungsweise widerspiegelt.

In der Vergangenheit wurden Epoxidharz-Phantome lediglich für die Anwendung bei einzelnen Wellenlängen hergestellt. In dieser Arbeit sollte ein Phantom mit den optischen Eigenschaften des Rattenhirns über einen breiten spektralen Bereich hergestellt werden.

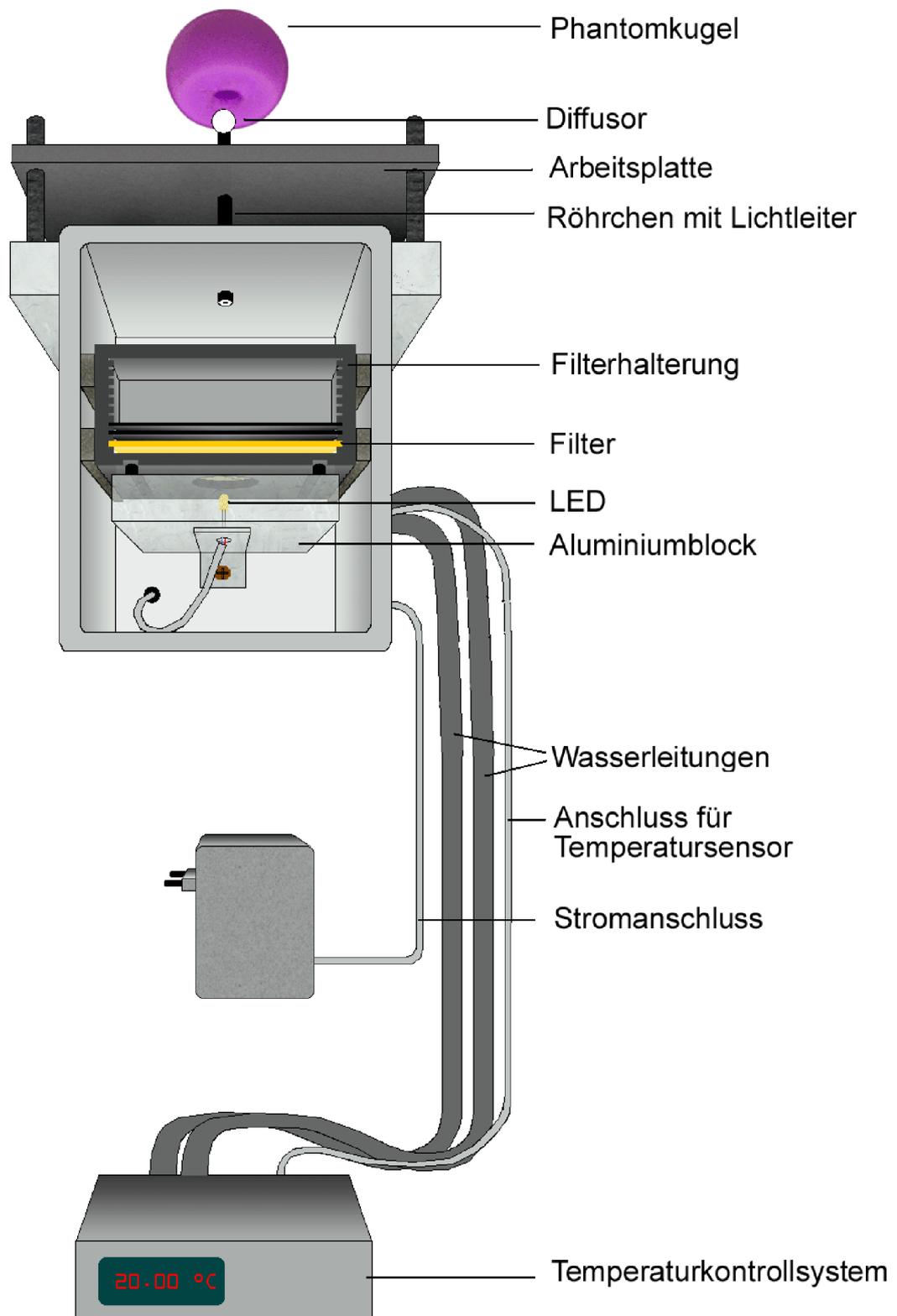
## 3 Material und Methoden

### 3.1 Aufbau des Kalibrierphantoms

Der Konstruktion des Kalibrierphantoms lagen zwei Anforderungen zugrunde: Zum einen sollte ein Phantom gebaut werden, welches die optischen Eigenschaften (Absorption und Streuung) des Rattenhirns und der lumineszierenden Stammzellen simuliert, zum anderen sollte mit diesem Phantom ein Luminometer kalibriert werden können.

Das Rattenhirn wurde durch Phantomkugeln nachgeahmt, die im Wellenlängenbereich der Biolumineszenz dem Rattenhirn ähnliche optische Eigenschaften aufwiesen. Um verschiedene Tiefen der Zellen im Gewebe darstellen zu können, wurden Kugeln mit verschiedenen Durchmessern (10 – 30 mm) hergestellt. In jede Kugel wurde ein 3 mm breiter Kanal bis zum Mittelpunkt gebohrt, so dass ein Lichtleiter in sie eingeführt werden konnte. Die Herstellung der Phantomkugeln ist in Abschnitt 3.2 beschrieben.

Die in alle Raumrichtungen lumineszierenden Stammzellen wurden durch eine Kugel aus einer TiO<sub>2</sub>-Epoxidharz-Mischung nachgestellt. Diese Kugel hatte einen Durchmesser von 3 mm und wurde an das distale Ende eines Lichtleiters geklebt. Als Lichtquelle diente eine Licht emittierende Diode (LED), die sich in einer lichtdichten Box befand. Die LED war in einen Aluminium-Block eingebettet, mit dem die Temperatur der LED permanent reguliert werden konnte. Direkt über der LED befand sich eine Blende, hinter der verschiedene Filter befestigt wurden. In die Oberseite der Box wurde ein Loch gebohrt, in das ein Plastikröhrchen mit einem Durchmesser von 2 mm geklebt wurde. In das Röhrchen wurde der Lichtleiter mit der TiO<sub>2</sub>-Kugel geklebt. Außerhalb der lichtdichten Box wurde das Röhrchen durch eine Arbeitsplatte geführt, deren Höhe dem Durchmesser der jeweiligen Phantomkugel angepasst werden konnte. Zum besseren Verständnis ist der Aufbau des Kalibrierphantoms schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Eine genaue Beschreibung der Lichteinheit ist in 3.4 zu finden.



**Abbildung 7**  
Darstellung des Aufbaus des Kalibrierphantoms

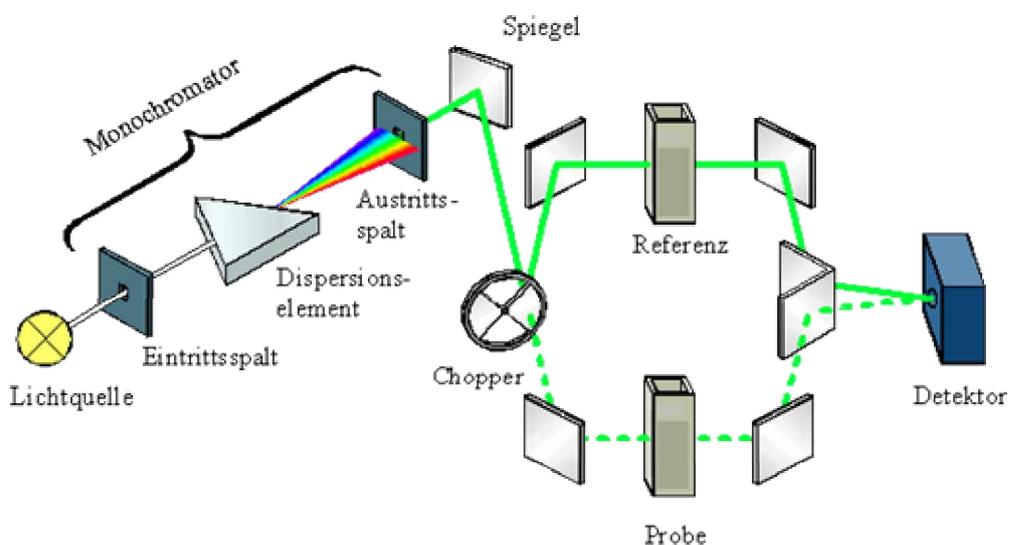
## 3.2 Photometrische Messgeräte

Insgesamt wurden vier verschiedene Messgeräte für die notwendigen Messungen verwendet. Mit dem UV-2100PC (Shimadzu, Japan) wurden sämtliche Absorptionsspektren bestimmt. Eine Messung von Emissionsspektren war mit diesem Gerät jedoch nicht möglich. Zu diesem Zweck wurde das Diodenarray-Spektrometer MMS (Zeiss, Jena) verwendet. Für nicht spektral aufgelöste Intensitätsmessungen von sehr schwachen Signalen wurde die NightOWL LB981 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) benutzt. Im Folgenden werden die Funktionsweise der einzelnen Geräte sowie der Ablauf der Messungen genauer beschrieben.

### 3.2.1 UV-2100PC

Beim UV-2100PC handelt es sich um ein Zweistrahl-Spektrometer, das über einen lichtdichten Probenraum mit einer Küvettenhalterung verfügt. Das Spektrometer arbeitet im sichtbaren Wellenlängenbereich mit einer Halogenlampe, deren Licht durch einen Monochromator auf einen Chopper gelenkt wird. Durch diesen wird der monochromatische Strahl in einen Proben- und einen Referenzstrahl zerlegt, die nach Durchlaufen der Probe- und Vergleichsküvette getrennt von einem Photomultiplier detektiert. Der Strahlengang in einem Zweistrahl-Spektrometer ist in Abbildung 8 zu sehen.

Der Transmissionswert wird durch Vergleich des Proben- mit dem Referenzsignal berechnet. Die Genauigkeit der Transmissionsmessungen liegt dabei laut Hersteller bei 0,1 %.



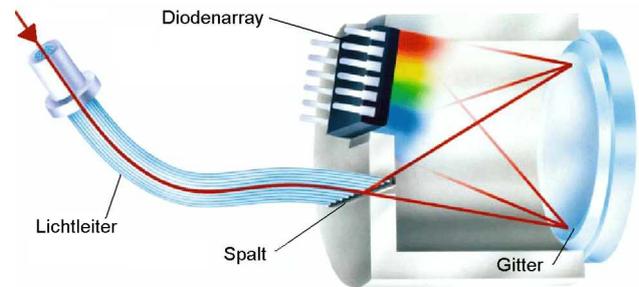
**Abbildung 8**  
Strahlengang in einem Zweistrahl-Spektrometer (nach [23])

Entsprechend der Theorie sollte der Transmissionswert einer Leermessung wellenlängenunabhängig bei 100% liegen. Allerdings lieferte das Gerät einen wellenlängenabhängigen Wert zwischen 125 – 127 %. Daher wurde vor jeder Messung mit dem UV-2100PC das Transmissionsspektrum  $T_0(\lambda)$  bei leerem Probenraum ermittelt und die Transmissionswerte  $T_{Probe}(\lambda)$  der folgenden Messungen mit diesem korrigiert:

$$T_{korrigiert}(\lambda) = T_{Probe}(\lambda) \cdot \left( \frac{100}{T_0(\lambda)} \right) \quad (3.1)$$

### 3.2.2 Monolithic Miniature Spektrometer (MMS)

Das MMS (Zeiss, Jena) koppelt das von einer Probe transmittierte oder emittierte Licht in einen Lichtleiter ein. Von diesem wird es auf einen Spalt gelenkt, hinter dem sich ein Beugungsgitter befindet. Anstelle des Ausgangsspalts befindet sich bei diesem Spektrometer ein Diodenarray, auf dem alle Wellenlängen des spektral zerlegten Signals gleichzeitig detektiert werden (Abbildung 9).



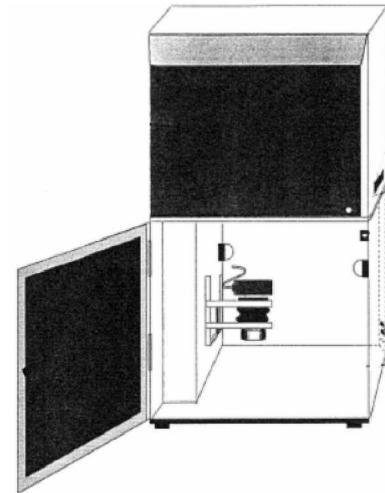
**Abbildung 9**  
Diodenarray-Spektrometer (nach [43])

Das Spektrometer wurde kalibriert, indem der Lichtleiter in einem definierten Abstand von einer Halogenlampe positioniert wurde. Die Bestrahlungsstärke der Halogenlampe für diesen Abstand war bekannt, so dass eine Beziehung zwischen den vom Diodenarray gemessenen Counts und der Bestrahlungsstärke hergestellt werden konnte.

### 3.2.3 NightOWL LC981

Bei der NightOWL LC981 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) handelt es sich um eine achromatische digitale Kamera, mit der die Detektion von sehr schwachen Lichtsignalen möglich ist. Der CCD-Chip und das Objektiv der Kamera befinden sich in einer Dunkelkammer auf einem Kameraschlitten. Dieser Schlitten wird von einem Rechner angesteuert, der den Fokus durch Verschieben von Objektiv und Kamera gegeneinander einstellt.

Bei der Bildgebung von schwachen Signalen ist die Reduktion von Rauschen im Bild wichtig. Dazu kann ein Dunkelbild mit der gleichen Belichtungszeit wie bei dem zu korrigierenden Bild aufgenommen werden, das pixelweise von diesem abgezogen wird.



**Abbildung 10**  
Aufbau der NightOWL LB981 [35]

Neben dem Rauschen wird das Signal auch durch das Übertragungsverhalten des Objektivsystems beeinflusst. Einflüsse können Staub, Kratzer und Abschattung (Vignettierung) durch das Objektiv und die Objektivfassung sein. Außerdem treten in der Quanteneffizienz der einzelnen Pixel des CCD-Chips Unregelmäßigkeiten im Bereich von etwa 1 % auf. Um diese Einflüsse zu eliminieren, wird das Bild einer homogen ausgeleuchteten weißen Fläche (Flat-Field) aufgenommen, so dass die Anzahl der einfallenden Photonen für jedes Pixel bekannt ist. Mit einem idealen Abbildungssystem müsste bei einer solchen Aufnahme jedes Pixel des Chips den gleichen Helligkeitswert erhalten. In einem realen System werden die einzelnen Helligkeitswerte aus oben genannten Gründen allerdings voneinander abweichen. Wird das Flat-Field Bild wie oben erläutert rauschkorrigiert, so kann anhand der Anzahl der ausgelösten Elektronen die Übertragungsfunktion des Systems für jedes einzelne Pixel berechnet werden. Mit dieser Übertragungsfunktion kann ein rauschkorrigiertes Bild so bearbeitet werden, dass der Helligkeitswert jeden Pixels proportional zur einfallenden Lichtmenge ist. Das hier beschriebene Verfahren zur Korrektur einer CCD-Aufnahme kann verbessert werden, indem nicht nur ein sondern mehrere Dunkel- und Weißlichtbilder gemacht werden, aus denen pixelweise der Mittelwert gebildet wird.

Die NightOWL bietet die Möglichkeit zur Rausch- und Flat-Field Korrektur einer Aufnahme. Während ein Dunkelbild jeweils direkt vor der Aufnahme gemacht werden muss, wurde eine Flat-Field Datei vom Hersteller bereitgestellt. Diese Flat-Field Datei resultierte aus mehreren Aufnahmen einer Leuchtdiode, die auf einer Matrix verschoben wurde. Die mitgelieferte Software WinLight32 berechnet die Menge der in der Objektebene emittierten Photonen. Diese Berechnung setzt Kenntnisse über die Abstrahlcharakteristik der Probe voraus, da es einen Unterschied macht, ob die Probe das gesamte Licht in Vorwärtsrichtung oder gleichmäßig über den Raum verteilt (isotrop) abstrahlt. Das Programm berechnet die Anzahl der emittierten Photonen unter der Annahme einer isotropen Abstrahlung. Im Falle der Biolumineszenz ist diese Annahme gerechtfertigt. Weiterhin wird bei der Berechnung vorausgesetzt, dass das gesamte in den unteren Halbraum abgestrahlte Licht reflektiert wird. Wird das nach unten abgestrahlte Licht dagegen vollständig absorbiert, so entspricht der berechnete Wert lediglich der Hälfte der tatsächlich emittierten Photonen. In der Realität wird das in den unteren Halbraum emittierte Licht weder vollständig reflektiert noch absorbiert werden. Der von der Software WinLight32 gelieferte Wert stellt daher nur eine Annäherung an den tatsächlichen Wert dar.

## 3.3 Phantomeinheit

### 3.3.1 Basismaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde als Basismaterial ein transparentes Epoxidharz (ME500, Nils Malmgren AB, Schweden) verwendet, das nach Zugabe eines Härter (H179B, Nils Malmgren AB, Schweden) innerhalb von 24 Stunden aushärtet. Das Verhältnis zwischen Harz und Härter muss genau 20:7 betragen, ansonsten wird das Harz klebrig (zu wenig Härter) oder spröde (zu viel Härter). Obwohl Harz und Härter flüssig sind, bezieht sich die Angabe 20:7 auf das Massenverhältnis der Komponenten. Das liegt daran, dass das Harz sehr dickflüssig ist und Luftbläschen einschließt, wodurch sich das Volumen verändert. Daher wurden Harz und Härter direkt im Mischbehälter auf einer Waage abgemessen.

Neben dem richtigen Verhältnis von Harz und Härter ist ein sorgfältiges Vermischen erforderlich, da das Harz sonst nicht vollständig aushärtet. Um eine möglichst homogene Masse zu erhalten, wurden Harz und Härter in dem verschlossenen Mischbehälter für etwa 2 Minuten auf einem Vortexer verrührt. Durch das Rühren wurde in das Harz Wärmeenergie eingebracht, die die Topfzeit des Harzes verkürzte. Um dem entgegen zu wirken, wurde das Harz nach dem Verrühren für 10 Minuten bei  $-20\text{ °C}$  gekühlt. Außerdem wurden durch das Vermischen auf dem Vortexer Luftbläschen in das Harz gerührt. Diese Luftbläschen verursachen Brechzahlunterschiede in dem Harz und beeinflussen so das Absorptions- und Streuverhalten. Daher wurde das gekühlte Harz in einen Exsikkator gestellt, der an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war. Nach einer Stunde war die Luft aus dem Harz entwichen.

Nach dem Evakuieren konnte das Harz in die Gussform gegossen werden. In dieser Arbeit wurden als Formen handelsübliche Küvetten und eine Form aus Teflon verwendet. Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von 10mm und bestanden entweder aus Acrylglas ( $n_{\text{Acryl}} = 1,49$ ) oder aus Polystyrol ( $n_{\text{Poly}} = 1,58$ ). Die Teflonform bestand aus zwei Platten, in die verschiedene Aushöhlungen gefräst waren. Die Aushöhlungen sparten Platz für Kugeln verschiedener Durchmesser aus. Für jede Aushöhlung war ein Kanal vorhanden, durch den das Harz in die zugeschraubte Form gegossen werden konnte. Wegen der starken Adhäsionskräfte ließ sich das ausgehärtete Harz nur schwer vom Teflon lösen. Daher wurde die Form vor dem Füllen mit einem Trennmittel (DAS400, Electrolube 2000, Köln) eingesprüht. Das Harz wurde in eine Spritze gefüllt und durch den Gusskanal in die Form gespritzt. Da hierbei

wieder Luft in das Harz eingebracht wurde, musste die gefüllte Teflonform abermals für eine Stunde in den Exsikkator gestellt werden. Allerdings musste das Harz vor dem Spritzen dennoch ein erstes Mal evakuiert werden, da sonst soviel Luft im Harz eingeschlossen war, dass die Form nach dem zweiten Evakuiervorgang nicht mehr vollständig gefüllt war.

Zur Bestimmung des Absorptionsspektrums einer Probe wurde mit dem UV-PC2100 deren Transmissionsspektrum gemessen. Das Absorptionsspektrum ergibt sich aus dem Transmissionsspektrum nach dem Lambert-Beer'sche Gesetz, wobei beachtet werden muss, dass es neben der Absorption auch zu Reflexion des eingestrahlten Lichts kommt. An den Grenzflächen zwischen Luft und Küvette und zwischen Küvette und Harz wird ein Teil des Lichts in Abhängigkeit von den Brechzahlunterschieden zwischen den Medien reflektiert. Der Reflexionsgrad ergibt sich bei senkrechter Bestrahlung aus den Fresnelschen Formeln:

$$R = \left( \frac{n_2 - n_1}{n_2 + n_1} \right)^2 \quad (3.2)$$

Das Lambert-Beer'sche Gesetz lautet in diesem Fall:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot (1 - R_{LK})^2 \cdot (1 - R_{KH})^2 \cdot e^{-\mu_a(\lambda) \cdot d} \quad (3.3)$$

$R_{LK}$  bezeichnet den Reflexionsgrad zwischen Luft und Küvette,  $R_{KH}$  den zwischen Küvette und Harz. Mit den Gleichungen (3.1) und (3.3) ergibt sich für den Absorptionskoeffizient  $\mu_a$ :

$$\mu_a(\lambda) = -\frac{1}{d} \cdot \ln \left( \frac{T_{korrigiert}(\lambda)}{(1 - R_{LK})^2 \cdot (1 - R_{KH})^2} \right) \quad (3.4)$$

Dabei ist  $d$  die Dicke der absorbierenden Schicht und  $T_{korrigiert}(\lambda)$  das mit der Leermessung korrigierte Transmissionsspektrum der Probe.

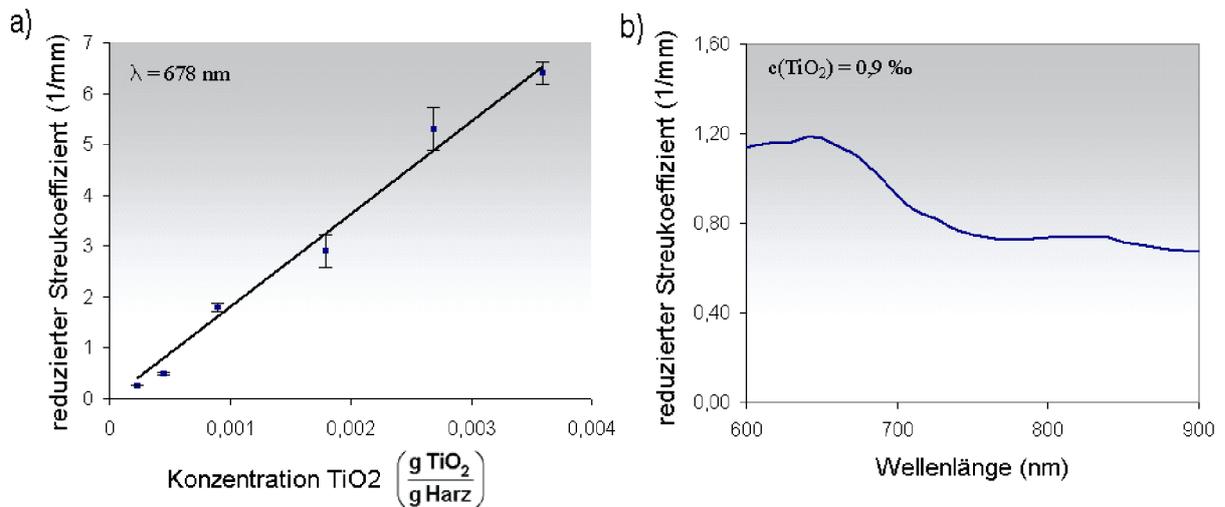
Der Reflexionsgrad ist eigentlich eine wellenlängenabhängige Größe. Diese Abhängigkeit ist allerdings im Vergleich zur Wellenlängenabhängigkeit der Transmission sehr gering und kann daher vernachlässigt werden. Aus Gleichung (3.4) folgt, dass zur Berechnung des Absorptionskoeffizienten der Brechungsindex des Epoxidharzes bekannt sein muss. Dieser wurde mit einem Abbe-Refraktometer (Modell A, Zeiss, Jena) ermittelt.

### 3.3.2 Absorber

Um das Absorptionsspektrum des Rattenhirns im Wellenlängenbereich der Biolumineszenz zu simulieren, wurden Tests mit verschiedenen Farbstoffen gemacht, die speziell zum Färben von Epoxidharzen eingesetzt werden (Epolight 5391, Epolight 5397, Epolight 5532, Epolight 5393, Epolight 5596, Epolight 7276C, Epolin Inc., USA). Vor dem Ansetzen von Proben wurde jedes Mal eine Stammlösung des entsprechenden Farbstoffs in Härter hergestellt. Das Ansetzen der Stammlösungen war nötig, da die Masse der Probe jeweils ca 10 g betrug und daher nur äußerst geringe Mengen der Farbstoffe benötigt wurden (abhängig von Farbstoff und gewünschter Konzentration ca. 0,05 mg Farbstoff pro Probe). Zum Abwiegen der Farbstoffe und der Harz-Komponenten wurde eine Präzisionswaage mit einer Genauigkeit von 0,01 mg verwendet (Sartorius BP211D, Göttingen). Um die Stammlösungen zu homogenisieren, wurden sie für eine Stunde in ein Ultraschallbad gegeben. Entsprechend der gewünschten Farbstoffkonzentration wurde bei der Probenherstellung eine bestimmte Menge der jeweiligen Stammlösung abgewogen und mit Härter und Harz aufgefüllt. Es wurde jeweils soviel Härter zugefügt, dass sich zusammen mit dem in der Stammlösung enthaltenen Härter ein Verhältnis von 20:7 zwischen Harz und Härter ergab.

### 3.3.3 Streumedium

Als Streumedium wurde  $\text{TiO}_2$  in der Rutil-Modifikation (Ti-Pure® Rutile R-960, DuPont, Belgien) verwendet. Die Partikel wiesen einen mittleren Durchmesser von 500 nm auf [8]. Wird das  $\text{TiO}_2$  in Epoxidharz gelöst, so ist der Streukoeffizient proportional zur Konzentration des  $\text{TiO}_2$  [40]. In [40] wurde die Konzentrationsangabe auf das Volumen und nicht auf die Masse des Harzes bezogen, während in dieser Arbeit das Epoxidharz nach Masse und nicht nach Volumen bemessen wurde. Mit Hilfe der bekannten Dichte des in dieser Arbeit verwendeten Harzes wurde daher aus dem von Willmann angegebenen Volumenanteil der Massenanteil des  $\text{TiO}_2$  berechnet [40]. Abbildung 11 a zeigt den so erhaltenen Zusammenhang zwischen dem Massenanteil des  $\text{TiO}_2$  und dem reduzierten Streukoeffizienten bei 678 nm. In Abbildung 11 b ist der von [40] gemessene spektrale Verlauf des reduzierten Streukoeffizienten bei einer  $\text{TiO}_2$ -Konzentration von 0,9 ‰ dargestellt.



**Abbildung 11**

(a) Abhängigkeit des reduzierten Streukoeffizienten einer Harz-TiO<sub>2</sub>-Mischung von der Konzentration des TiO<sub>2</sub>. Die Fehlerbalken geben die statistische Messunsicherheit aufgrund von 7 Einzelmessungen an. (b) Spektrum des reduzierten Streukoeffizienten einer Harz-TiO<sub>2</sub>-Mischung. Die Daten wurden anhand der Abbildungen aus [40] rekonstruiert.

Der reduzierte Streukoeffizient hängt auch von dem Brechungsindex des verwendeten Harzes ab. Zwar wurde von [40] ein anderes Harz als in dieser Arbeit verwendet, dessen Brechungsindex war jedoch lediglich um 0,02 größer als der des hier benutzten Harzes.

### 3.3.4 Phantome

Für die Herstellung der Phantomkugeln wurde eine Stammlösung aus Harz und TiO<sub>2</sub> angesetzt und mit einer Stammlösung aus Härter und den Farbstoffen Epolight 5393 und Epolight 5397 vermischt. Die Mischung wurde gekühlt, in den Exsikkator gestellt und danach in die Kugelhohlräume der Teflonform gegossen. Nachdem ein zweites Mal evakuiert wurde, härtete das Harz aus und wurde nach 48 Stunden aus der Form gelöst.

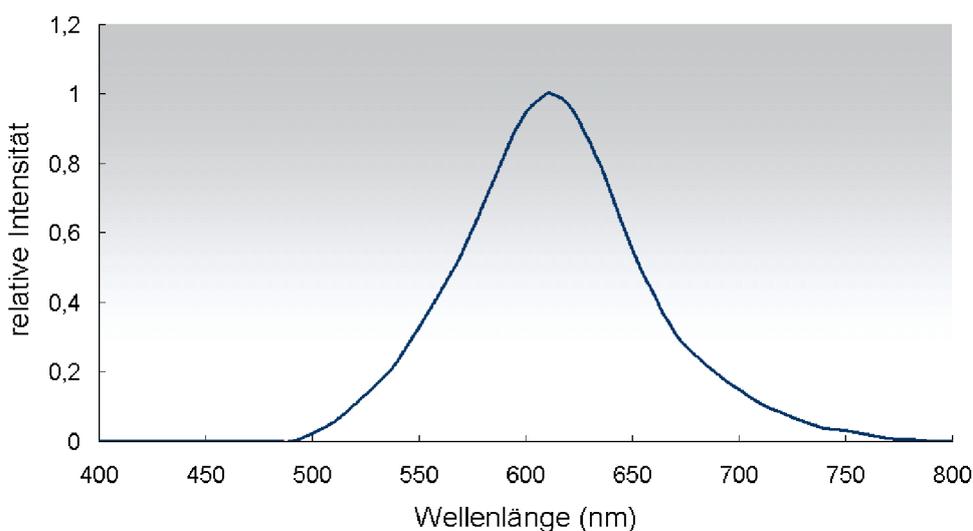
Durch das Trennmittel, mit dem die Form eingesprüht worden war, hatten sich feine Bläschen auf der Oberfläche der Form gebildet. Aufgrund dieser Bläschen wiesen die Phantome keine ebene Oberfläche auf und mussten nachträglich bearbeitet werden. Dazu wurden die Kugeln in kreisenden Bewegungen mit Schleifpapier poliert. Es wurde zunächst 120er, dann 400er, 600er und zuletzt im Nassschliff 1000er Papier verwendet. In jede Phantomkugel wurde von unten ein 3 mm breiter Kanal bis zum Mittelpunkt der Kugeln gebohrt. An der Unterseite wurden die Kugeln angefräst, so dass sie eine ebene Fläche besaßen, auf der sie stehen konnten.

## 3.4 Kalibriereinheit

### 3.4.1 Biolumineszierende Stammzellen

Um eine LED und Filter zur Simulation der biolumineszierenden Zellen auswählen zu können, mussten vorab deren Intensität und Emissionsspektrum vermessen werden. Entsprechend der Menge an Zellen, die ins Rattenhirn implantiert werden, wurde die Intensität von 100.000 Zellen gemessen. Dazu wurden insgesamt 1,5 Millionen Zellen in 1,5 ml Pufferlösung (PBS 0,1 M, pH 7,4) gegeben und mit 150  $\mu$ l Luziferin (Endkonzentration 10  $\mu$ g / ml) vermengt. Die Lösung wurde in 15 Tropfen (je 110  $\mu$ l mit 100.000 Zellen) aufgeteilt. Diese Tropfen wurden in Petrischalen gegeben und in den Dunkelraum der NightOWL gelegt. Die Belichtungszeit der Aufnahme betrug 5 Minuten, die Rauschkorrektur wurde wie in 3.2.3 beschrieben vorgenommen.

Während die Intensität des von den Zellen emittierten Lichts je nach Zelltyp und Vitalität der Zellen variieren kann, wird sein Emissionsspektrum vor allem von der exprimierten Luziferase bestimmt. Bei der hier verwendeten Zelllinie handelt es sich um C17.2-Stammzellen, die die Firefly-Luziferase Fluc<sup>+</sup> exprimieren. Das Emissionsmaximum dieser Luziferase weist eine starke Temperaturabhängigkeit auf und verschiebt sich von 578 nm bei 25 °C zu 612 nm bei 37 °C [44]. Der genaue Verlauf des Spektrums ist in Abbildung 12 abgebildet.

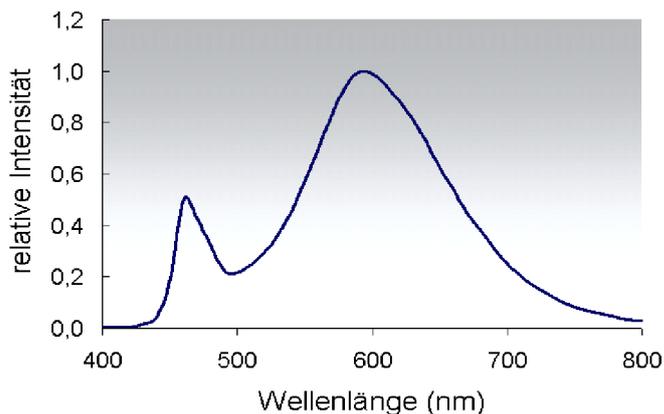


**Abbildung 12**

Emissionsspektrum der Fluc<sup>+</sup>-Luziferase bei 37 °C (rekonstruiert nach [44])

### 3.4.2 Lichtquelle

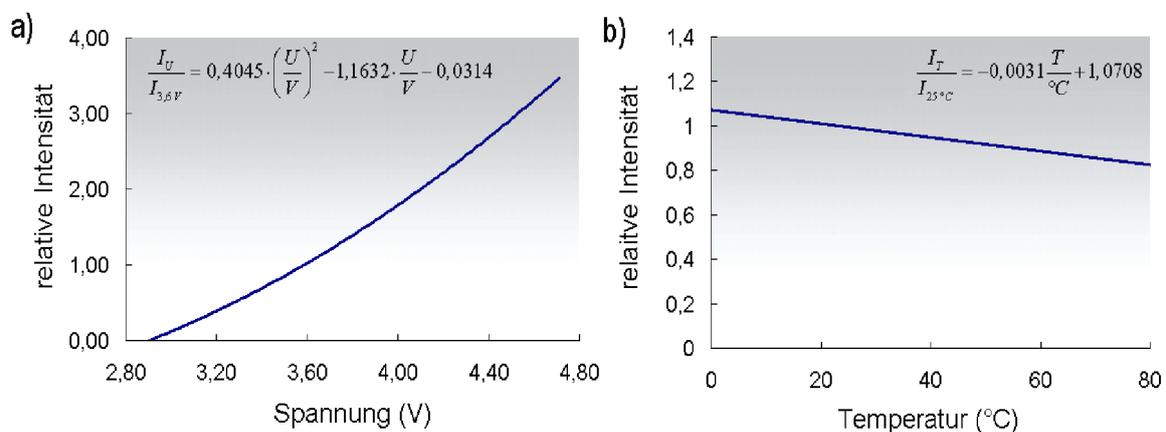
Zur Simulation der Zellen wurde eine warm-weiße LED (NSPL510S, Nichia, Japan) verwendet. Das Spektrum dieser LED weist nach Herstellerangaben zwei Emissionsmaxima bei 470 nm und bei 600 nm auf (Abbildung 13).



**Abbildung 13**

Spektrum der LED nach Herstellerangaben (die Daten wurden aus einer graphischen Abbildung rekonstruiert).

Die Intensität einer LED hängt ausschließlich vom durch sie fließenden Strom ab. Allerdings verändert sich die Leitfähigkeit eines Halbleiters mit der Temperatur, so dass sich der Strom und damit auch die Intensität bei Temperaturschwankungen verändert. Andererseits hängt der Strom auch von der anliegenden Spannung ab, die nur mit einer endlichen Genauigkeit eingestellt werden kann. Aus den in Bezug auf diese Zusammenhänge vom Hersteller angegebenen Diagrammen wurden mehrere Datenpunkte abgelesen und durch die in Abbildung 14 dargestellten Funktionen angenähert. Die Angabe der relativen Intensität bezieht sich auf die Intensität bei einer Spannung von 3,6 V (Abbildung 14 a) bzw. bei 25 °C (Abbildung 14 b).

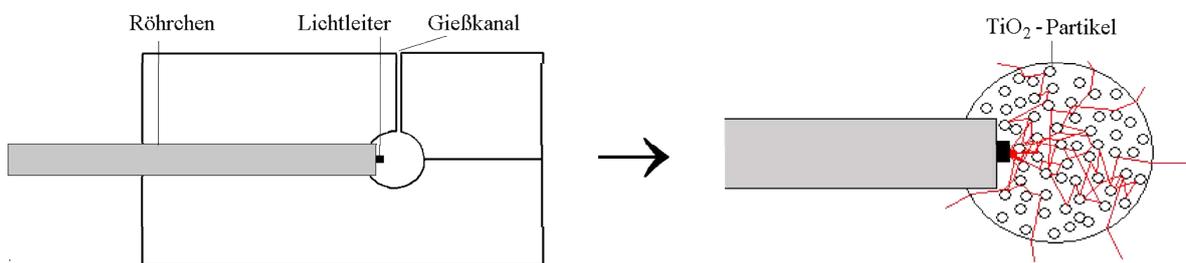


**Abbildung 14**

Temperatur- und Spannungsabhängigkeit der Intensität der Nichia-LED nach Herstellerangaben (die Daten wurden aus einer graphischen Abbildung rekonstruiert).

### 3.4.3 Implementierung in die Phantomeinheit

Die biolumineszierenden Stammzellen verhalten sich wie Kugelstrahler und emittieren Licht gleichmäßig über alle Richtungen verteilt. Eine solche Abstrahlcharakteristik ist mit einer LED alleine nicht realisierbar. Daher wurde das LED-Licht zunächst in einen Quarzglaslichtleiter (AS400/440IRAN, FiberTech GmbH, Berlin) mit einem Kerndurchmesser von 400  $\mu\text{m}$  eingekoppelt. Zur Stabilisierung wurde der Lichtleiter in ein Röhrchen mit 2 mm Durchmesser geklebt. Dieses Röhrchen wurde in die Teflonform gelegt, so dass sich das distale Ende des Lichtleiters in einem Kugelhohlraum mit 3 mm Durchmesser befand. Um die Abstrahlcharakteristik der biolumineszierenden Stammzellen zu simulieren, wurde eine Mischung auf Harz und  $\text{TiO}_2$  angesetzt. Die Konzentration des  $\text{TiO}_2$  betrug 0,4 %, nach den Angaben von Willmann (3.3.3) sollte die Mischung demnach einen reduzierten Streukoeffizienten von  $7,3 \text{ mm}^{-1}$  aufweisen. Das Harz wurde durch einen dünnen Kanal in die Form gespritzt und härtete 48 Stunden lang aus. Durch das  $\text{TiO}_2$  kommt es in der Kugel zu Mehrfachstreuung, das abgestrahlte Licht ist nahezu isotrop (Abbildung 15).



**Abbildung 15**

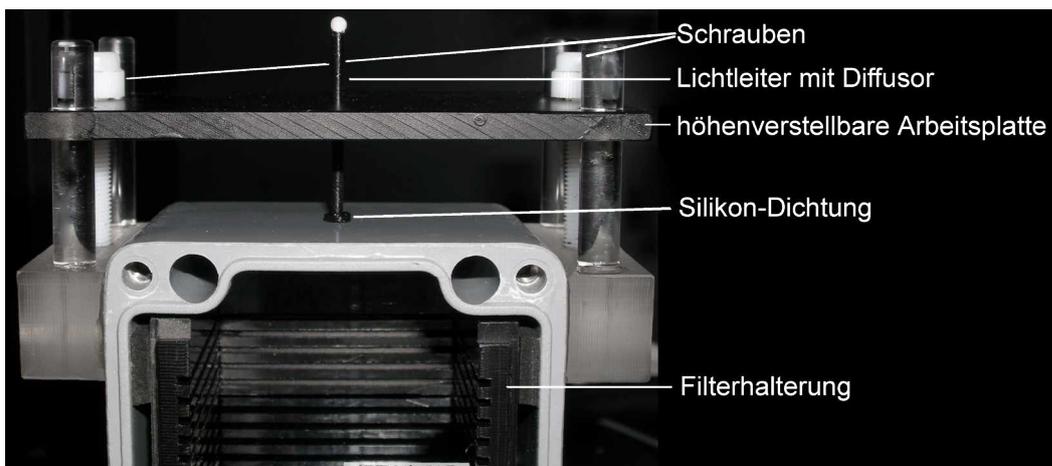
Schematische Darstellung der Teflonform und der Streuung im Diffusor.

Die LED selbst wurde in einer lichtdichten Box befestigt. In die Oberseite dieser Box wurde ein knapp 2 mm breites Loch gebohrt, in das das Röhrchen mit dem Lichtleiter gesteckt wurde. Das Röhrchen saß zwar sehr fest, wurde aber zur Abdichtung zusätzlich mit Silikon verklebt. Einem Verkippen des Lichtleiters, das zu Abweichungen der eingekoppelten Lichtmenge führen würde, wurde so vorgebeugt.

Außerhalb der lichtdichten Box wurde der Lichtleiter durch eine Plattform geführt, die mit der Box verschraubt war (Abbildung 16). Durch Drehen der Schrauben konnte die Höhe der Plattform verstellt werden, so dass der Lichtleiter jeweils exakt bis zu Mitte der jeweiligen Phantomkugel eingeführt werden konnte.

### 3.4.4 Filter

Das Emissionsspektrum der LED wies ein Hauptmaximum bei 585 nm und Nebenmaximum bei 460 nm auf. Um das LED-Spektrum dem der Biolumineszenz anzunähern, wurde zwischen der LED und dem Lichtleiter ein Farbglasfilter (FG13, Reichmann Feinoptik, Brokdorf) angebracht. Dazu wurde eine Filterhalterung mit Schlitzen für den Farbglasfilter und verschiedene weitere Filter in der lichtdichten Box befestigt (Abbildung 16).

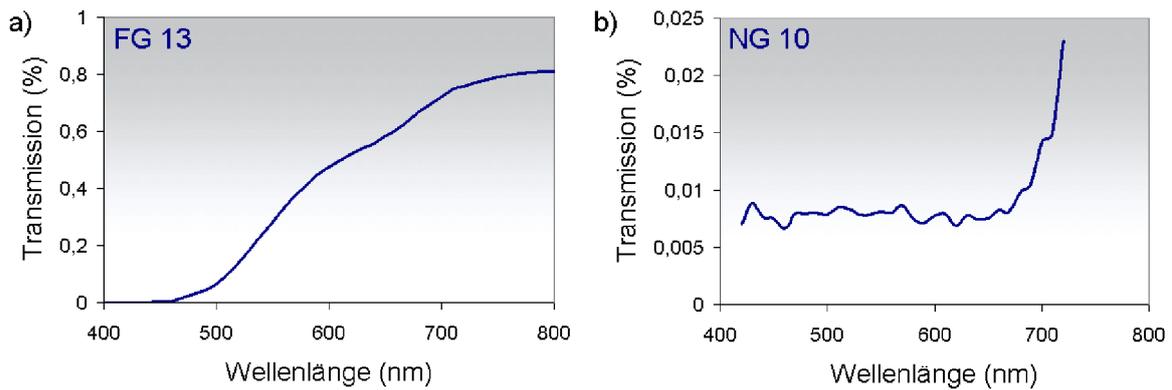


**Abbildung 16**  
Befestigung des Lichtleiters und der Filter im Phantom

Der Filter FG13 absorbiert Licht unterhalb von 500 nm, das Emissionsspektrum der LED bei 460 nm wird von ihm nicht durchgelassen. Das vom Hersteller angegebene Transmissionspektrum dieses Filters ist in Abbildung 17 a dargestellt. Das gefilterte LED-Spektrum wurde mit dem MMS gemessen.

Die Intensität, die durch den Filter FG13 und den Diffusor transmittiert wurde, war um den Faktor 3000 größer als die von 100.000 biolumineszierenden Stammzellen gelieferte Intensität. Hinter dem Farbglasfilter wurde daher zusätzlich ein Neutralgraufilter (NG10, Reichmann Feinoptik, Brokdorf) angebracht, der 99,9 % des einfallenden Lichts nahezu unabhängig von der Wellenlänge absorbiert. Abbildung 17 b zeigt das Transmissionspektrum dieses Neutralgraufilters. Oberhalb von 700 nm lässt er deutlich mehr Licht durchfallen als im restlichen Wellenlängenbereich, das LED-Spektrum wird daher durch den Filter nicht vollkommen unverändert übertragen.

Mit dem Phantom sollte es aber außerdem möglich sein, verschiedene Mengen leuchtender Zellen darzustellen. Die Intensität des in den Lichtleiter eingekoppelten Lichts sollte daher variabel sein. Normalerweise könnte dies leicht durch Veränderung der an der LED anlie-

**Abbildung 17**

Transmissionsspektren des Farbglasfilters FG13 (a) und des Neutralgraufilters NG10 (b) nach Herstellerangaben. Die Daten wurden anhand einer graphischen Abbildung rekonstruiert.

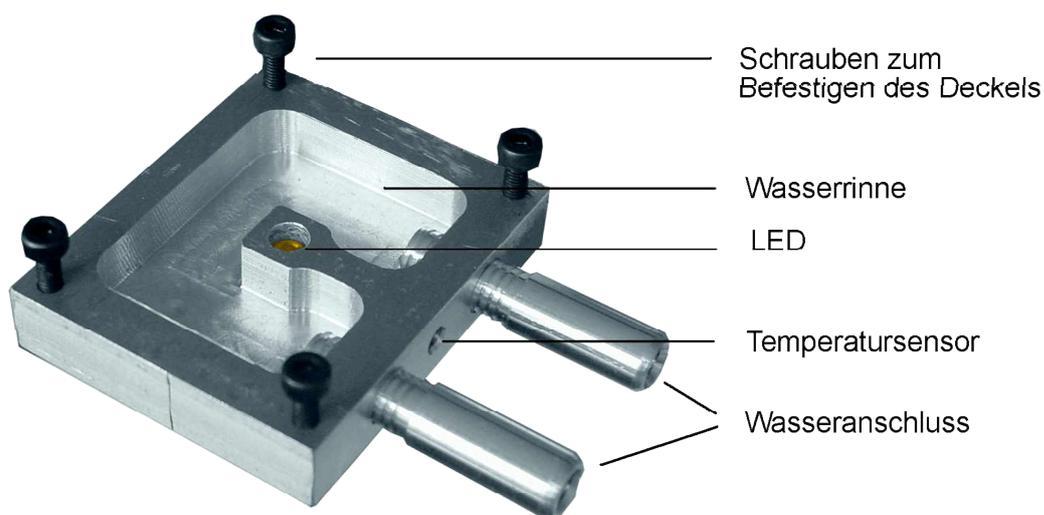
genden Spannung realisiert werden. Diese musste für die Kalibrierfunktion des Phantoms allerdings sehr konstant gehalten werden. Bei einem fest eingestellten Spannungswert kann eine höhere Genauigkeit als bei einer variablen Spannungsquelle erreicht werden. Daher wurde die Spannungsversorgung der LED nicht variabel gestaltet (eine genauere Beschreibung der Spannungsversorgung ist im folgenden Abschnitt 3.4.5 zu finden). Um dennoch die Intensität des in den Lichtleiter eingekoppelten Lichts beeinflussen zu können, wurde hinter den schon eingebrachten Filtern Platz für weitere Neutralgraufilter (NG3, NG4, NG5, NG9, NG11, NG12, Reichmann Feinoptik, Brokdorf) geschaffen. Diese Filter wiesen Transmissionswerte von 2,5 % – 90 % auf, die Intensität ließ sich somit durch Kombination von verschiedenen Filtern variieren. Dabei ist zu beachten, dass die Gesamttransmission einer Filter-Kombination nicht nur von deren Einzeltransmissionen sondern auch von ihrer Position bestimmt wird. Der vom Hersteller angegebene Verlauf der Transmissionsspektren dieser Filter entspricht dem des Filters NG10, ab 700 nm steigt die Transmission deutlich an.

### 3.4.5 Strom- und Temperaturkonstanz

Die Intensität des von der LED emittierten Lichts wird von der anliegenden Spannung und der Temperatur der LED beeinflusst. Um eine konstante Intensität zu gewährleisten, mussten also sowohl die Spannung also auch die Temperatur möglichst konstant gehalten werden.

Für die Spannungsversorgung wurde eine Präzisions-Spannungsquelle verwendet, die eine Spannung von 3 V lieferte (AD780, Analog Devices, München). Die von dieser Spannungsquelle gelieferte Spannung wird von einem sehr geringen Rauschen im Bereich von 0,6 ppm überlagert und wird lediglich von Schwankungen in der Umgebungstemperatur der Spannungsquelle beeinflusst. Nach Herstellerangaben beträgt die Temperaturabhängigkeit maximal 3 ppm / °C. In einem klimatisierten Raum kann die Temperatur um etwa 5 °C variieren, die Gesamtschwankung beträgt dann 15,6 ppm. Entsprechend liefert die Spannungsquelle eine Spannung von  $3\text{ V} \pm 47\text{ }\mu\text{V}$ .

Zur Temperaturregelung wurde die LED in einen Aluminium-Block eingebettet, der durch eine Wasserzuleitung mit einem Temperaturkontrollsystem (Temperaturregler, medres – medical research GmbH, Köln) verbunden war (Abbildung 18). Die nötigen Anschlüsse für Wasser- und Strom waren in der NightOWL vorhanden. Ein Temperatursensor ermittelte durchgehend die Temperatur des Aluminiumblocks, aufgrund derer entweder ein Heiz- oder ein Kühlelement ansprang. So gelang es, die Temperatur bei 20 °C mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,01\text{ }^\circ\text{C}$  einzustellen.



**Abbildung 18**  
Darstellung des Aluminiumblocks

### 3.4.6 Glowell-Standard

Beim Glowell-Standard (Glowell Low Light Imaging Standard Green, Lux Biotechnologies, England) handelt es sich um eine Tritiumquelle, durch deren Strahlung ein phosphoreszierendes Material angeregt wird. Dieses Material emittiert Licht mit der gleichen spektralen Verteilung wie die biolumineszierenden Stammzellen. Über der Phosphorschicht ist ein Neutralgraufilter angebracht, hinter dem sich eine Platte mit 5 verschiedenen großen Blenden befindet. Für jede Apertur wurde vom Hersteller der transmittierte Lichtstrom quantifiziert. Allerdings war selbst die dunkelste Apertur 50.000-mal heller als das Licht von 100.000 lumineszierenden Stammzellen, daher musste der Glowell-Standard abgedunkelt werden. Dazu wurde eine Mischung aus dem Epoxidharz und dem Farbstoff Epolight 7276C hergestellt. Der Massenanteil des Farbstoffs betrug 0,6 %. Das Harz wurde in eine Petrischale gegossen und härtete darin aus. Nach dem Aushärten wurde ein 5 mm dickes Plättchen in der Form des Glowell-Standards aus dem Harz gefräst (Abbildung 19). Mit diesem Plättchen bedeckt war die Intensität der hellsten Apertur des Glowell-Standards nur noch geringfügig größer als die von 100.000 biolumineszierenden Zellen.



**Abbildung 19**  
Glowell-Standard und Filter aus Epoxidharz

## 4 Ergebnisse

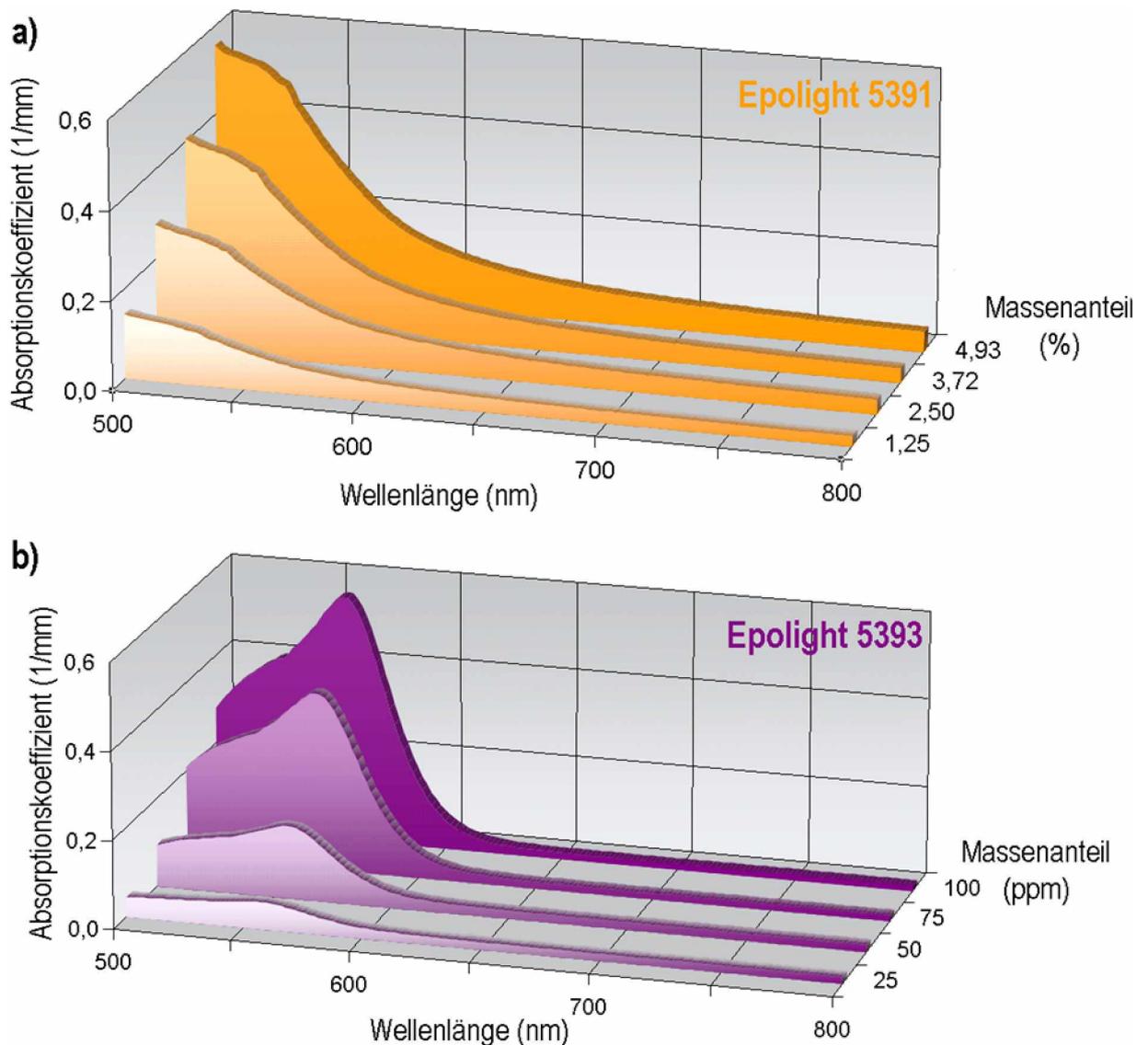
### 4.1 Phantomeinheit

Um herauszufinden, welche Konzentration der einzelnen Farbstoffe zu Absorptionskoeffizienten im Bereich der Absorption des Rattenhirns führte, wurden zunächst jeweils vier Proben mit einem Massenanteil der Farbstoffe zwischen 1% - 0,001% hergestellt. Die Proben wurden in Küvetten gegossen und 48 Stunden später mit dem UV-2100PC untersucht. Der Zeitraum von 48 Stunden war nötig, weil einige Farbstoffe aufgrund der chemischen Reaktion zwischen Harz und Härter nachdunkelten. Beispielsweise verursachte der Farbstoff Epolight 5393 im flüssigen Harz lediglich einen leichten Gelbstich, ausgehärtet erschien das Harz jedoch lila. Mit dem Farbstoff Epolight 5397 war das Harz vor dem Aushärten sogar absolut klar, während nach 48 Stunden eine tiefe Blautönung entstand.

Um aus den Transmissionsmessungen der Phantomproben deren Absorptionsspektrum bestimmen zu können, muss der Brechungsindex des Epoxidharzes bekannt sein. Hierzu wurde ein dünnes Plättchen des Epoxidharzes hergestellt und mit einem Abbe-Refraktometer untersucht. Es ergab sich der Wert  $n_{\text{Harz}} = 1,56$ . Mit den bekannten Brechungsindizes der Acryl- und Polystyrolküvetten ( $n_{\text{Acryl}} = 1,49$  und  $n_{\text{Poly}} = 1,58$ ) konnte das Absorptionsspektrum der einzelnen Phantomproben nach Gleichung (3.4) berechnet werden.

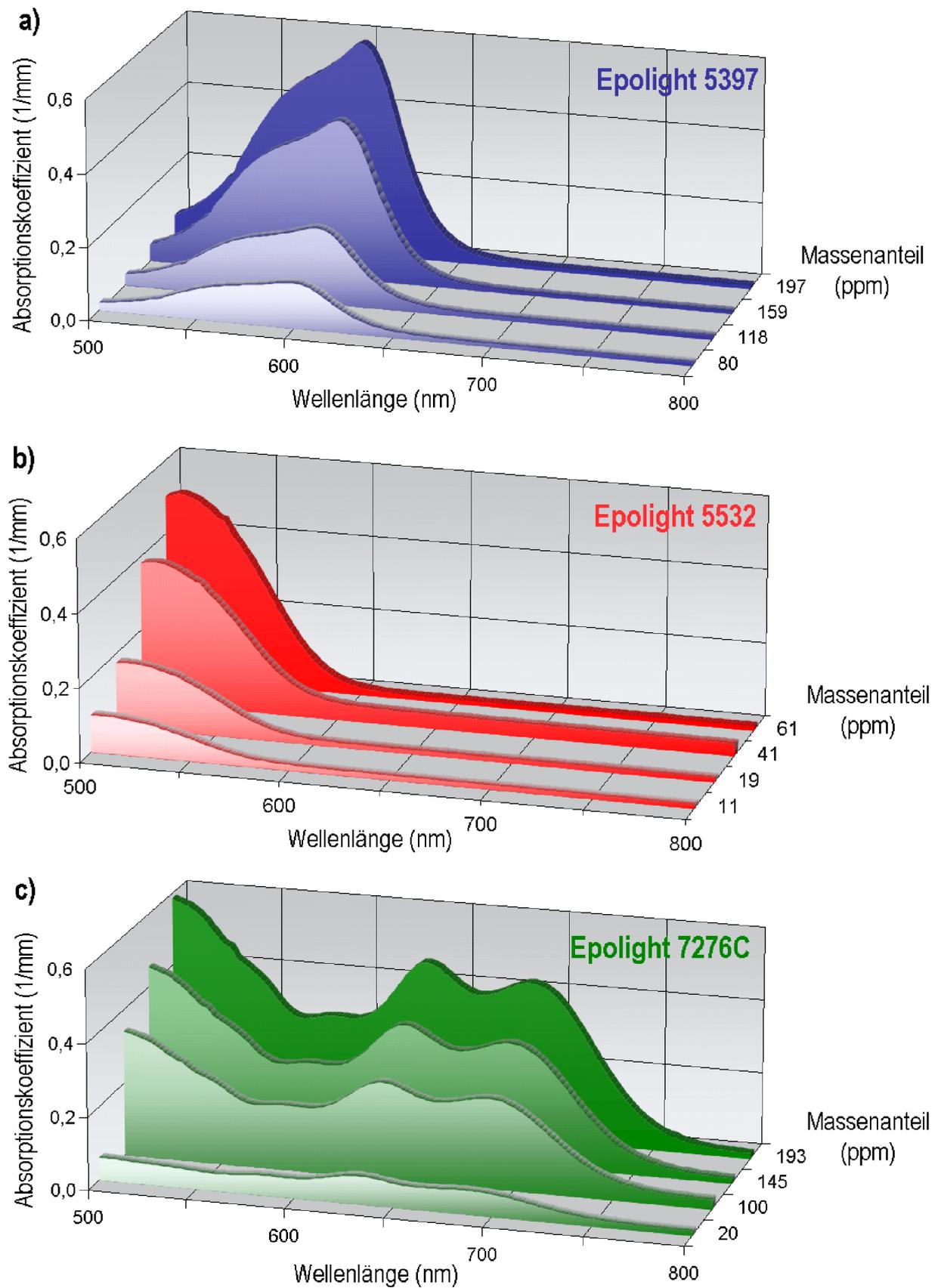
Unter den getesteten Farbstoffen befanden sich fünf schmalbandige Absorber (Epolight 5391, Epolight 5397, Epolight 5532, Epolight 5393, Epolight 5596), die im untersuchten Wellenlängenbereich ein Absorptionsmaximum bei einer bestimmten Wellenlänge ( $\lambda_{\text{max}} = 500$  nm, 556 nm, 600 nm und 506 nm) aufwiesen, und ein Breitbandabsorber (Epolight 7276C) mit mehreren Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\text{max}} = 500$  nm, 634 nm und 686 nm).

Um beim jeweiligen Absorptionsmaximum einen Absorptionskoeffizient im Bereich von  $0,1 / \text{mm} - 1 / \text{mm}$  zu erzielen, wurden weitere Farbstoffproben mit variierenden Massenanteilen hergestellt. Der Massenanteil lag bei allen Farbstoffen im Bereich von 50 ppm – 200 ppm, lediglich beim Farbstoff Epolight 5391 wurden Konzentrationen von einigen % benötigt. Die genauen Massenanteile können in Abbildung 20 und Abbildung 21 abgelesen werden. Bei allen Farbstoffen wurde das Absorptionsspektrum mit steigender Farbstoffkonzentration gespreizt, der Absorptionskoeffizient an den Maxima nahm also stärker zu als an anderen Stellen im Spektrum (Abbildung 20 und Abbildung 21).



**Abbildung 20**

Absorptionsspektren der Farbstoffe Epolight 5391 (a) und Epolight 5393 (b) bei verschiedenen Konzentrationen.

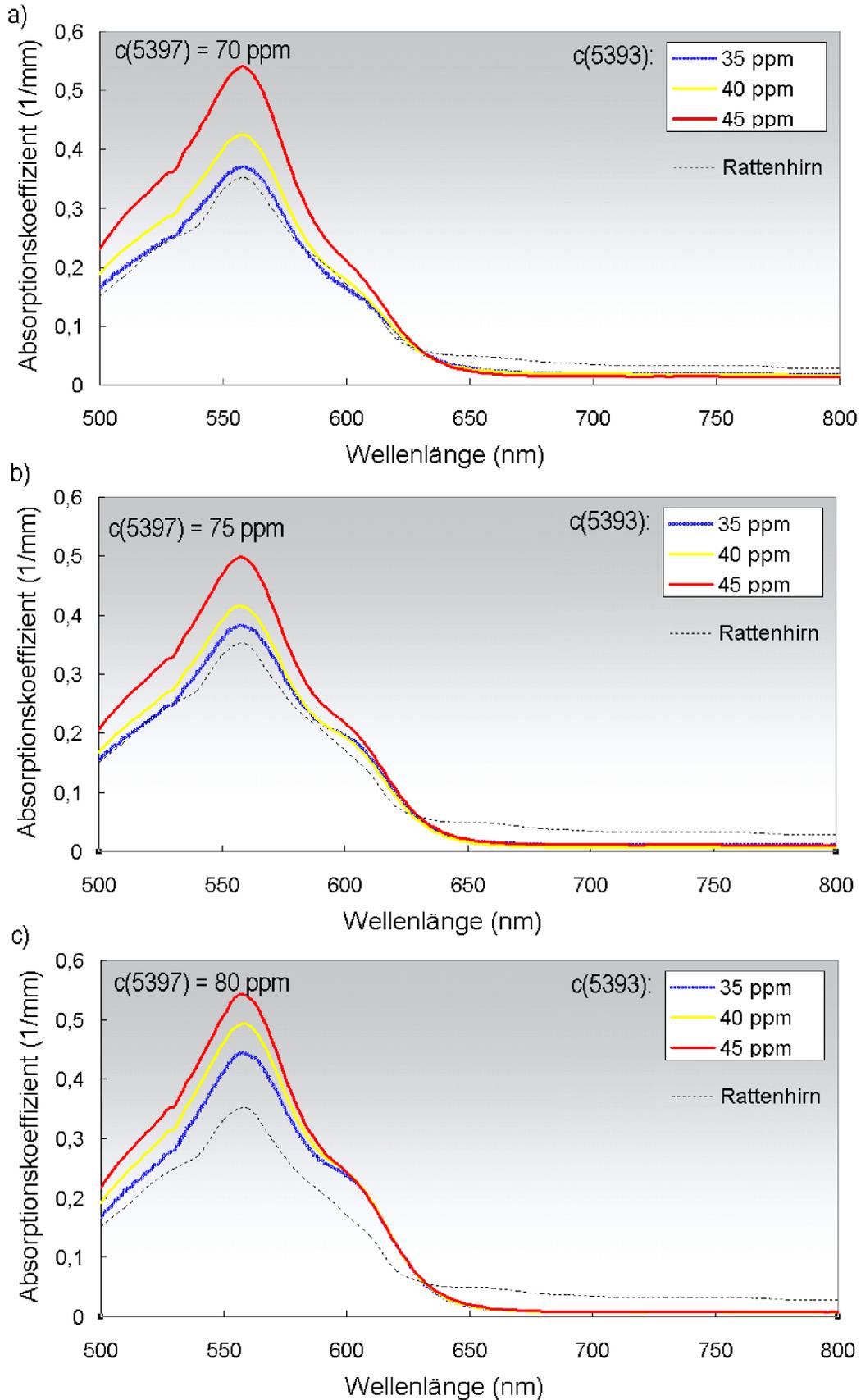
**Abbildung 21**

Absorptionsspektren der Farbstoffe Epolight 5397 (a) und Epolight 5532 (b) und Epolight 7276C bei verschiedenen Konzentrationen.

Keiner der Farbstoffe konnte ein dem Rattenhirns entsprechendes Absorptionsspektrum im Harz erzeugen. Das Maximum des Farbstoffs Epolight 5393 liegt zwar im richtigen Bereich (560 nm), der spektrale Verlauf des Absorptionskoeffizienten ist jedoch steiler als der des Rattenhirns. Um das Absorptionsspektrum des Farbstoffs Epolight 5393 zu verbreitern, wurden Mischungen des Farbstoffs Epolight 5393 mit variierenden Konzentrationen des Farbstoffs Epolight 5397 hergestellt. Der Farbstoff Epolight 5397 hat ein Absorptionsmaximum bei 600 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbiert der Farbstoff 5393 kaum noch Licht, während das Rattenhirn dort einen Absorptionskoeffizienten von  $0,17/\text{mm}$  aufweist (nach [36]). Mit der richtigen Mischung der beiden Farbstoffe sollte es also möglich sein, das Absorptionsspektrum des Rattenhirns nachzubilden.

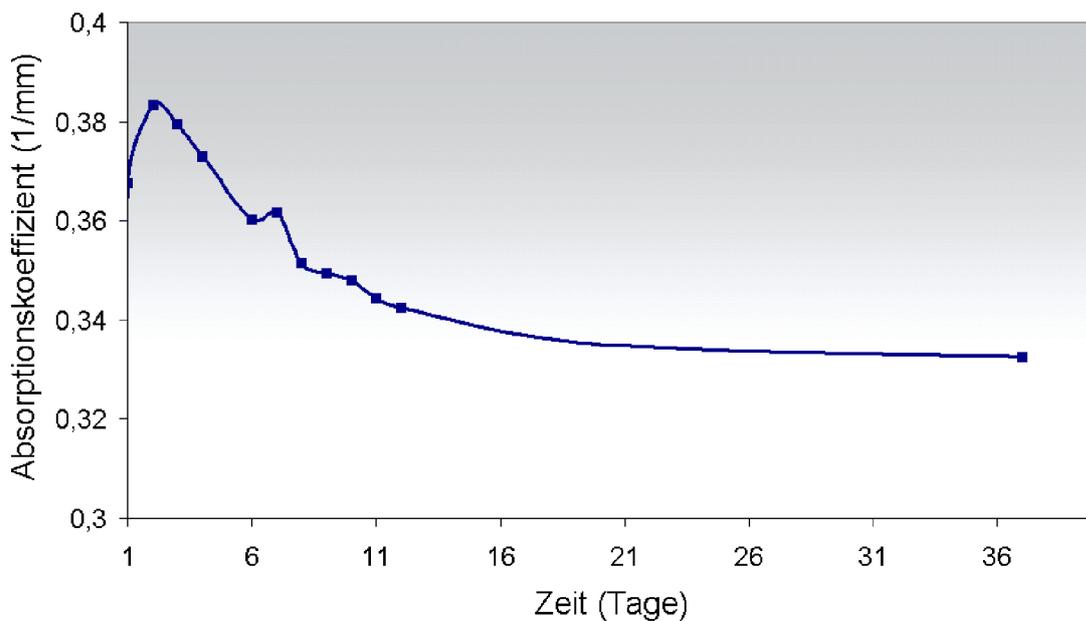
Um das richtige Verhältnis der Farbstoffe zu finden, war es vorteilhaft, einen Farbstoff jeweils auf eine feste Konzentration einzustellen und die Konzentration des anderen Farbstoffs zu variieren. Dazu wurden drei Stammlösungen mit verschiedenen Konzentrationen des Farbstoffs Epolight 5397 in Harz und eine Stammlösung des Farbstoffs Epolight 5393 in Härter hergestellt. Die Konzentration des Farbstoffs Epolight 5397 konnte so sehr konstant eingestellt werden, da dessen Stammlösungen einfach statt des Harzes verwendet werden konnten. Den Harz-Stammlösungen wurden jeweils verschiedene Mengen der Stammlösung des Farbstoffs Epolight 5393 und entsprechend viel Härter zugefügt. Die Proben härteten in Küvetten aus und ihre Transmissionsspektren wurden 48 Stunden später mit dem UV-2100PC vermessen. Die Absorptionsspektren wurden mit Gleichung (3.4) berechnet.

Abbildung 22 zeigt die Absorptionsspektren, die sich bei einem Massenanteil des Farbstoffs 5397 von 70 – 80 ppm und einem Massenanteil des Farbstoff 5393 von 35 – 45 ppm ergeben. Anhand dieser Abbildung ist zu erkennen, dass die Absorptionskoeffizienten bei den Wellenlängen 560 nm und 600 nm vom Massenanteil beider Farbstoffe abhängen und daher nicht getrennt eingestellt werden können. Der Farbstoff Epolight 5397 verursacht bei Massenanteilen  $> 70$  ppm eine unerwünschte Schulter bei 600 nm im Absorptionsspektrum, der Farbstoff Epolight 5393 sorgt für ein Absorptionsmaximum bei 560 nm, das bei Konzentrationen über 35 ppm für deutliche höhere Absorptionskoeffizienten als beim Rattenhirn sorgt. Am besten wurde das Absorptionsspektrum des Rattenhirns mit einer Mischung angenähert, in der der Massenanteil des Farbstoffs 5397 70 ppm und der des Farbstoffs 5393 35 ppm betrug. Allerdings war der Absorptionskoeffizient bei 600 nm bei dieser Mischung geringfügig niedriger als der des Rattenhirns.

**Abbildung 22**

Absorptionsspektren verschiedener Mischungen der Farbstoffe Epolight 5397 und Epolight 5393. Die Konzentration von Epolight 5397 wurde in a), b) und c) jeweils konstant gehalten, die Konzentration von Epolight 5393 wurde variiert.

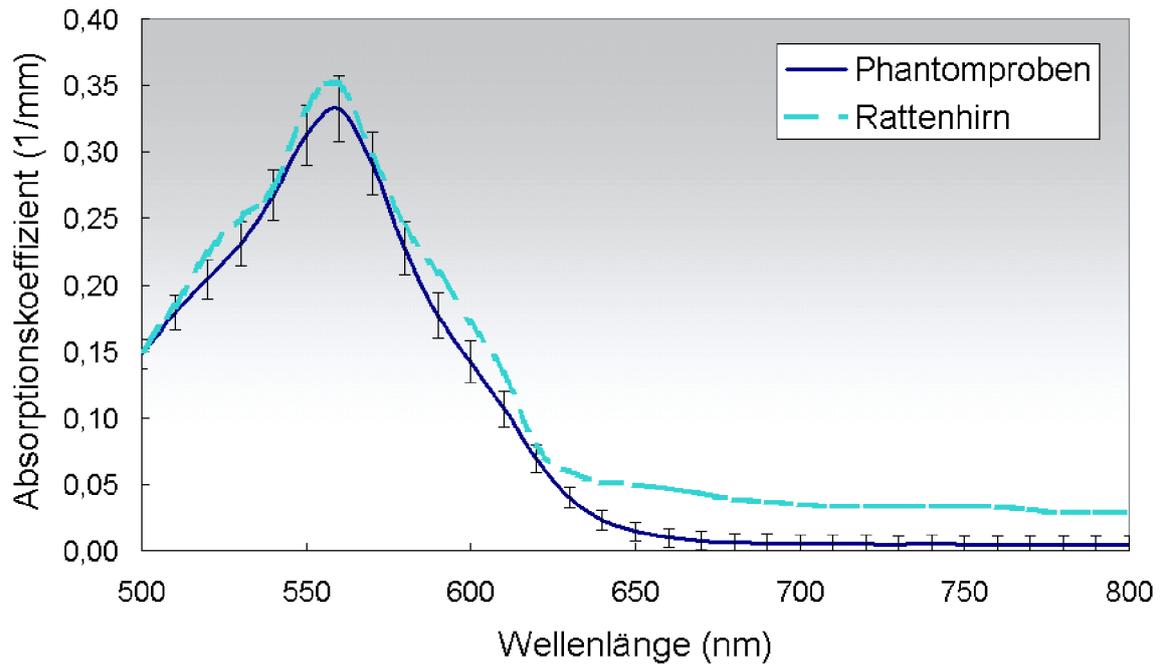
Um den Absorptionskoeffizient bei 600 nm zu verringern, musste die Konzentration des Farbstoffs Epolight 5397 reduziert werden. Da sich dadurch auch der Absorptionskoeffizient bei 560 nm verkleinert, wurde die Konzentration des Farbstoffs Epolight 5393 gleichzeitig leicht vergrößert. Für die Herstellung der Phantomkugeln wurde der Massenanteil des Farbstoffs Epolight 5397 daher auf 71 ppm und der des Farbstoffs Epolight 5393 auf 34 ppm eingestellt. Mit der Stammlösung, die hierzu angesetzt wurde, wurden 30 Phantomproben in Polystyrol-Küvetten hergestellt. Das Absorptionsspektrum dieser Phantomproben wurde über einen Zeitraum von fünf Wochen täglich mit dem UV-2100PC bestimmt, um die Stabilität des eingestellten Spektrums zu überprüfen. Nach jeder Messung wurden die 30 Absorptionsspektren gemittelt und für jede Wellenlänge die Standardabweichung vom Mittelwert bestimmt. Abbildung 23 zeigt den zeitlichen Verlauf des mittleren Absorptionskoeffizienten bei 560 nm über fünf Wochen.



**Abbildung 23**

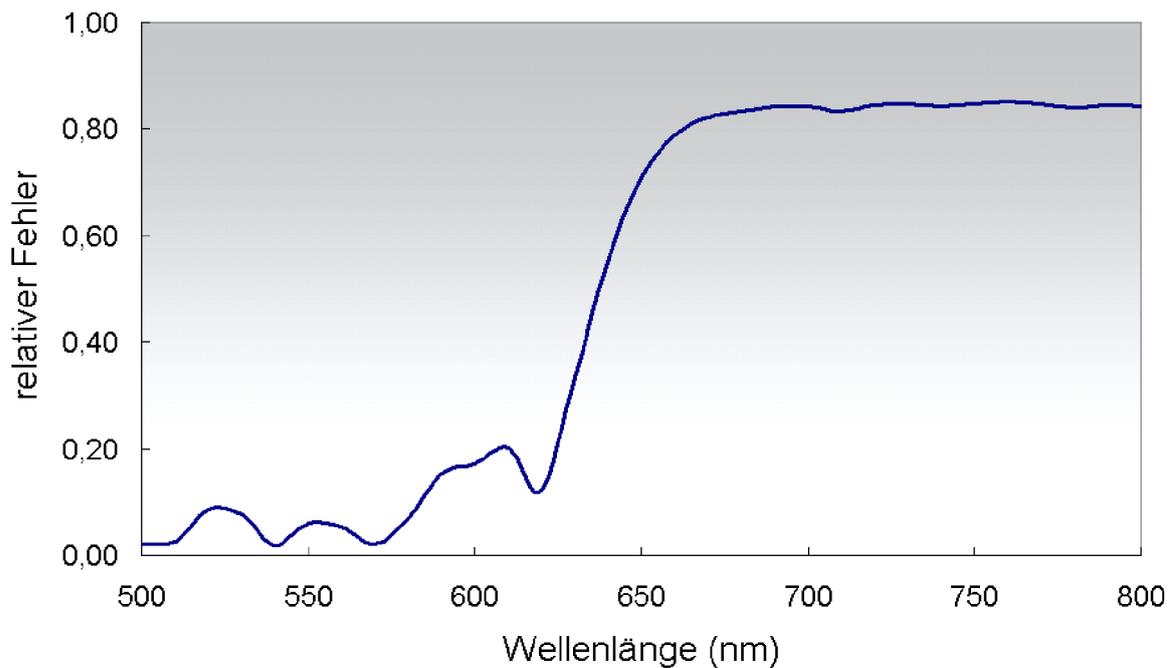
Zeitverhalten des Absorptionskoeffizienten bei 560 nm. Es wurde über 30 Phantomproben gemittelt.

In Abbildung 23 spiegelt sich das beobachtete Nachdunkeln der Phantomproben bis zum zweiten Tag wieder. Der Absorptionskoeffizient stieg zunächst auf einen Wert von 0,38 / mm und fiel im weiteren Verlauf wieder auf 0,33 / mm ab. Nach ca. drei Wochen war der Absorptionskoeffizient stabil. Das nach 37 Tagen ermittelte mittlere Absorptionsspektrum der Phantomproben sowie dessen Standardabweichung ist in Abbildung 24 abgebildet. Die Absorption des Rattenhirns wurde mit der Farbstoffmischung gut nachgebildet.

**Abbildung 24**

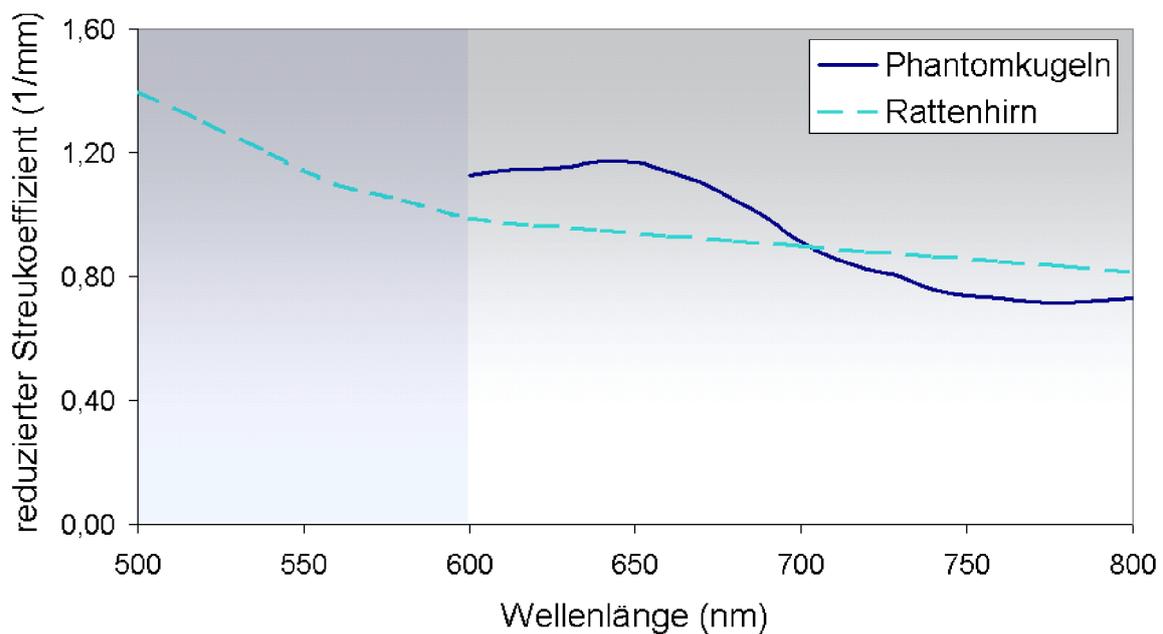
Mittleres Absorptionsspektrum des Epoxidharzes mit einem Massenanteil von 71 ppm Epolight 5397 und 34 ppm Epolight 5393. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 30 Messwerten an.

Die relative Abweichung des mittleren Absorptionskoeffizienten der Phantomproben von dem des Rattenhirns ist in Abbildung 25 dargestellt. Unterhalb von 630 nm war der relative Fehler kleiner als 20 %, bei höheren Wellenlängen stieg er auf etwa 80 % an.

**Abbildung 25**

Relative Abweichung des Absorptionskoeffizienten der Phantome von dem des Rattenhirns

Mit der Stammlösung, die auch für die 30 Phantomproben verwendet wurde, wurden fünf Phantomkugeln hergestellt. Dazu wurde diese Stammlösung mit einer Mischung aus Harz und  $\text{TiO}_2$  vermischt. Der Massenanteil des  $\text{TiO}_2$  in den Phantomkugeln wurde so auf  $5,8 \cdot 10^{-4}$  eingestellt. Nach den Angaben von Willmann [40] (siehe auch Abschnitt 3.3.3) wird mit dieser Konzentration der reduzierte Streukoeffizient bei 678 nm auf einen Wert von 1,05 eingestellt. Anhand des von [40] ermittelten Verlaufs des reduzierten Streukoeffizienten von  $\text{TiO}_2$  in Epoxidharz ergibt sich das in Abbildung 26 abgebildete Streuspektrum.



**Abbildung 26**

Spektrum des reduzierten Streukoeffizienten der Rattenhirn-Phantome berechnet nach den Angaben von Willmann [40]. Im Bereich von 500 nm – 600 nm wurden von Willmann keine Werte erhoben.

## 4.2 Kalibriereinheit

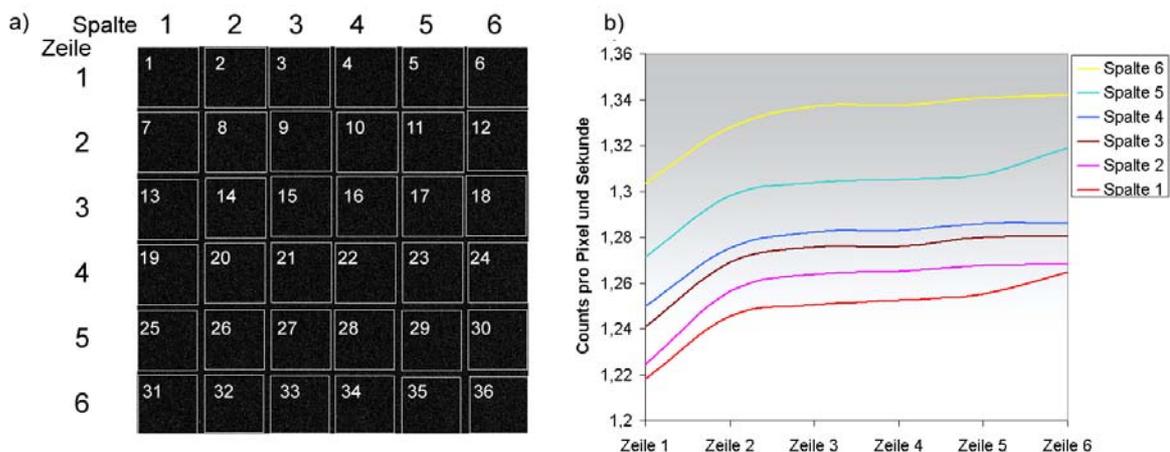
### 4.2.1 NightOWL LC981

#### Rauschkorrektur

Das Rauschsignal betrug in den Aufnahmen der lumineszierenden Stammzellen zwischen 20 und 100 % des Nutzsignals. Um aus dem gemessenen Signal das Nutzsignal bestimmen zu können, muss man den Wert des Rauschsignals genau kennen. Die Stärke des Rauschens fluktuiert aber aufgrund von Schwankungen der Chiptemperatur. Werden Messreihen über mehrere Stunden gemacht, so verändert sich die Stärke des Rauschens von Bild zu Bild. Die Rauschkorrektur mit einem Dunkelbild eignet sich daher nicht für solche Messreihen.

Stattdessen wurde die Verteilung des Rauschens im Bild untersucht, indem die Aufnahmen obiger Messreihe in 36 Rechtecke unterteilt wurden (Abbildung 27 a). Es zeigte sich, dass das Rauschen von links nach rechts zunahm, wobei es im mittleren Bildfeld innerhalb einer Spalte nahezu konstant war (Abbildung 27 b). Dieser Verlauf hängt mit der Ausleserichtung des Chips (das zuletzt ausgelesene Pixel wird stärker von Rauschen überlagert) und von der Lage des Verstärkers (die ihm zugewandte Seite des Chips wird erwärmt) zusammen.

Zur Rauschkorrektur der folgenden Aufnahmen wurde jeweils ein Messfeld auf das zu messende Objekt gelegt und ein Messfeld der gleichen Größe knapp ober- oder unterhalb des Objekts. Der Messwert der Probe wurde korrigiert, indem der Messwert des Rauschfelds abgezogen wurde.

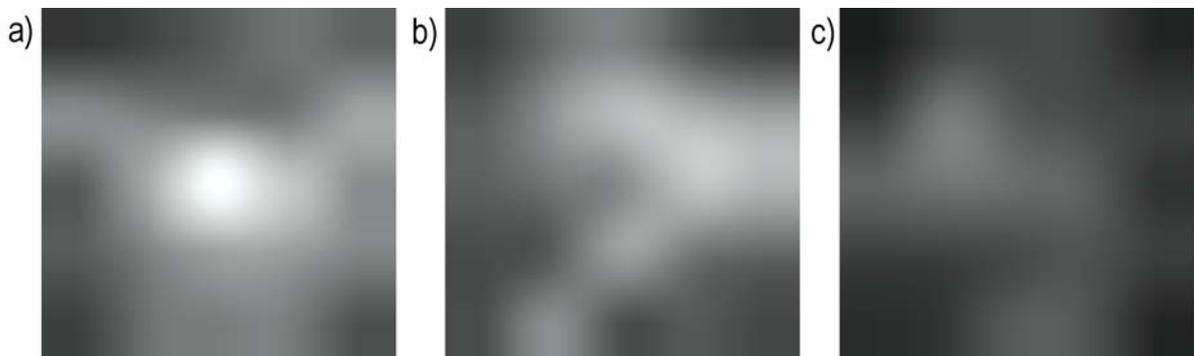


**Abbildung 27**

Lage der Messfelder bei der Auswertung einer Dunkelbild-Messreihe (a) und durchschnittliche Verteilung des Rauschens über das Bild (b). Es wurde über 150 Aufnahmen gemittelt.

### Flat-Field Korrektur

Erste Aufnahmen, die mit der mitgelieferten Flat-Field Datei korrigiert wurden, wiesen eine ungleichmäßige Helligkeitsverteilung auf. Um zu klären, ob möglicherweise ein Fehler bei der Erstellung des Flat-Fields gemacht wurde, wurde eine konstant strahlende Lichtquelle (Glowell-Standard, siehe 3.4.6) bei drei verschiedenen Objektweiten auf einer  $5 \times 5$ -Matrix im Bild verschoben. Dazu wurden auf einem Papier, das das Bild jeweils vollständig ausfüllte, 25 Punkte markiert, an die der Lichtstandard nacheinander gelegt wurde. In jeder Einstellung wurde eine rauschkorrigierte Aufnahme mit und eine ohne Flat-Field Korrektur gemacht. Die 25 Aufnahmen wurden einzeln ausgewertet. Die 25 Werte jeder Aufnahme wurden in Grauwerte übertragen und ein Bild mit  $1000 \times 1000$  Pixeln interpoliert. Die so berechneten Grauwertbilder sind in Abbildung 28 abgebildet. Die Vignettierung des Objektivs war bei allen drei Objektweiten noch deutlich sichtbar, die vom Hersteller gelieferte Flat-Field Korrektur kann sich daher nicht auf das installierte System beziehen. Die zeitliche Limitierung dieser Arbeit ließ das Erstellen einer eigenen Flat-Field Datei nicht zu, daher musste bei der Auswertung aller erstellten Aufnahmen auf eine Flat-Field Korrektur verzichtet werden.



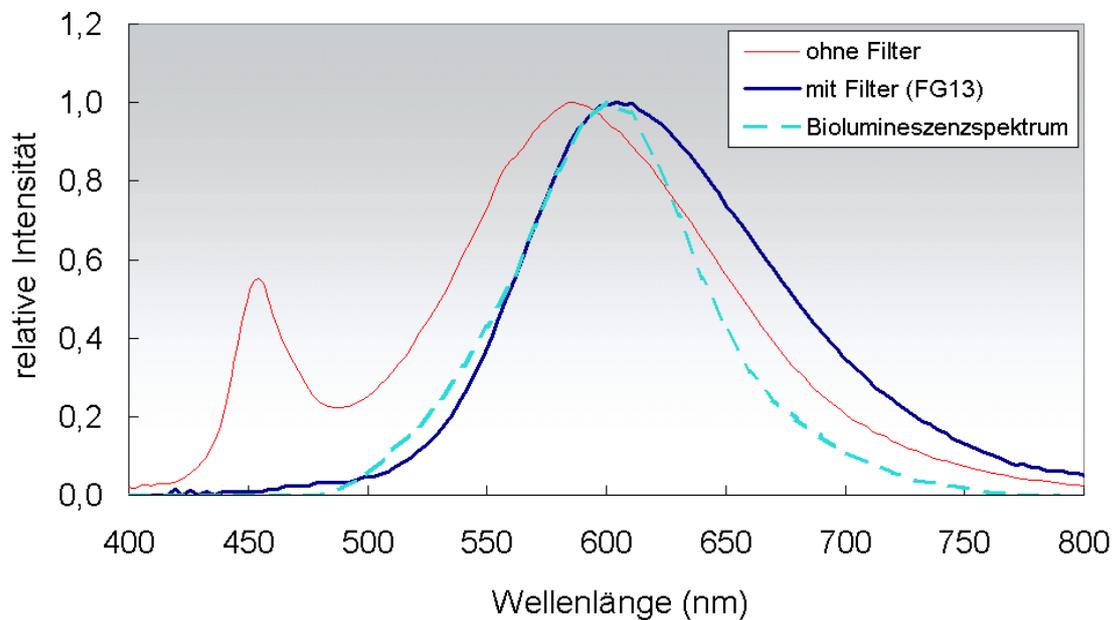
**Abbildung 28**

Darstellung der mit der gelieferten Flat-Field-Datei korrigierten Weißlichtbilder. Die Bilder wurden durch Interpolation von 25 über das Bild verteilten Messwerten erzeugt: (a) geringe Objektweite, (b) mittlere Objektweite, (c) große Objektweite

#### 4.2.2 Spektrum der Lichtquelle

Mit dem Dioden-Array-Spektrometer wurden das Emissionsspektrum der LED und das Spektrum, das sich nach Filterung mit dem Filter FG13 ergab, gemessen. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse dieser Messung abgebildet.

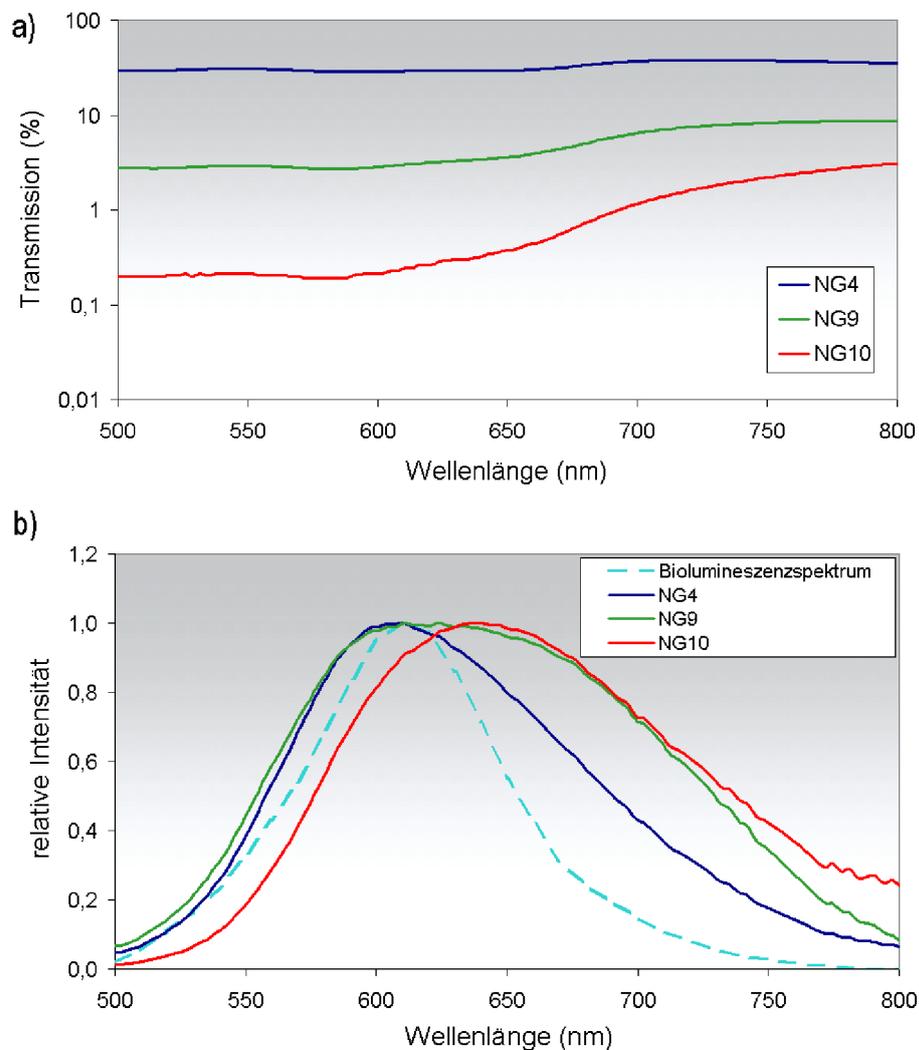
Die Intensität der biolumineszierenden Zellen wurde in zwei unabhängigen Messreihen mit jeweils 15 mal 100.000 Zellen bestimmt. Nach Zugabe des Luziferins stieg die Intensität des emittierten Lichts langsam an und erreichte in der ersten Messreihe nach 65 Minuten, in der Zweiten nach 100 Minuten ihr Maximum. Aus den Aufnahmen zum Zeitpunkt der maximalen Lichtemission wurde die Menge der pro Zellhaufen und Sekunde emittierten Photonen bestimmt und wie in 3.2.3 beschrieben rauschkorrigiert. Der Mittelwert der von 100.000 Zellen emittierten Lichtmenge betrug 108.000 Photonen/Sekunde. Die Standardabweichung lag bei 12.000 Photonen/Sekunde. Für diese Berechnung wurden beide Messreihen berücksichtigt.



**Abbildung 29**

Spektrn der LED ohne und mit dem Farbfiler FG13. Beide Spektrn wurden mit dem MMS gemessen.

Um in diesen Intensitätsbereich zu gelangen, wurde das LED-Licht durch verschiedene Neutralgraufilter gefiltert. Das Spektrum hinter diesen Filtern war wegen der geringen Intensität mit dem MM-Spektrometer nicht mehr messbar. Daher wurden die Transmissionspektren der Neutralgraufilter mit dem UV-2100PC gemessen und das Spektrum berechnet, das durch Filterung der LED mit ihnen und dem Filter FG13 entsteht. Die Transmissionspektren der Filter NG10, NG9 und NG4 sowie die jeweiligen LED-Spektren sind in Abbildung 30 dargestellt. Nur mit dem Filter FG13 wurde das Biolumineszenzspektrum gut nachgebildet. Durch die wellenlängenabhängige Transmission der Neutralgraufilter verschob sich jedoch das Maximum nach 640 nm und das Spektrum verbreiterte sich. Dadurch wurde das Biolumineszenzspektrum lediglich im Bereich von 500 nm – 630 nm gut widerspiegelt.



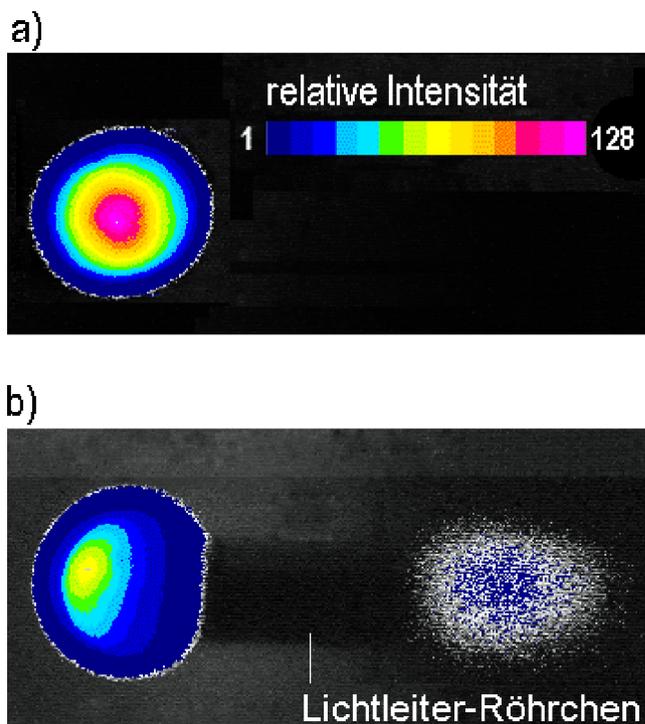
**Abbildung 30**

Transmissionspektren der Filter NG4, NG9 und NG10 (a) und die Spektren der mit diesen Filtern und dem Filter FG13 gefilterten LED (b). Die Transmissionspektren wurden mit dem UV-PC2100 gemessen und mit ihnen die Emissionsspektren berechnet.

### 4.2.3 Abstrahlcharakteristik des Diffusors

Das LED-Licht wurde in einen Lichtleiter eingekoppelt, an dessen Ende eine Diffusionskugel aus Harz und  $\text{TiO}_2$  geklebt wurde. Mit dieser Kugel sollte eine über alle Richtungen gleichmäßige Abstrahlcharakteristik erzielt werden. Die Kugel absorbierte den größten Teil des in den Lichtleiter eingekoppelten Lichts, daher konnte die Abstrahlcharakteristik visuell nicht bewertet werden. Stattdessen wurden mit der NightOWL zwei Aufnahmen vom Lichtleiter – einmal von oben und einmal von der Seite – gemacht. Zusätzlich wurde In jeder Position eine beleuchtete Aufnahme gemacht und mit der Lumineszenz-Aufnahme in Falschfarben überlagert. Abbildung 31 zeigt die überlagerten Bilder.

Zwar war die Abstrahlung des Diffusors kaum vorwärts gerichtet, eine isotrope Abstrahlung konnte jedoch nicht erzielt werden. Die Abstrahlung zur Seite war dazu zu gering. Der Lichtfleck auf dem Lichtleiter-Röhrchen deutet darauf hin, dass das Röhrchen an dieser Stelle einen Riss hat. Die Intensität des austretenden Lichts ist jedoch so gering, dass dies auf die Aufnahmen des von oben betrachteten Diffusors wahrscheinlich keinen Einfluss hat.



**Abbildung 31**

Abstrahlung des Lichtleiters von oben (a) und von der Seite (b). In beiden Position wurde eine Lumineszenz-Aufnahme mit der NightOWL LC981 gemacht und in Falschfarben mit einer photographischen Aufnahme überlagert.

#### 4.2.4 Strom- und Temperaturkonstanz

Die LED sollte als Kalibrierlichtquelle verwendet werden, ihr Lichtstrom sollte demnach möglichst konstant gehalten werden. Dabei muss beachtet werden, dass die Lichtemission ein statistischer Prozess ist und die Zahl der innerhalb eines Zeitraums emittierten Photonen nach der Poissonstatistik mit der Standardabweichung  $\sqrt{N}$  um den Mittelwert  $N$  schwankt. Die relative Abweichung sinkt also mit steigender Photonenzahl. Im Vergleich zu diesem sogenannten Photonenrauschen wird der größte Teil der Intensitätsschwankungen der LED durch Fluktuationen der angelegten Spannung und der Umgebungstemperatur verursacht. Im Folgenden soll abgeschätzt werden, mit welcher Genauigkeit die Intensität des LED-Lichts eingestellt werden konnte.

Um das Photonenrauschen abschätzen zu können, muss die mittlere Zahl der pro Sekunde emittierten bzw. transmittierten Photonen bekannt sein. Da der Transmissionskoeffizient des Diffusors nicht gemessen werden konnte, wurde die mittlere Zahl der pro Sekunde transmittierten Photonen anhand einer Aufnahme des Phantoms mit der NightOWL bestimmt. Als Filter wurden der Farbglasfilter FG13 und der Neutralgraufilter NG10 eingesetzt. Die Messung lieferte einen Wert von  $N = 311.000$  Photonen pro Sekunde. Die relativen Intensitätsfluktuationen aufgrund des Photonenrauschens betragen dann:

$$\frac{\sqrt{N}}{N} = \frac{1}{\sqrt{N}} = \frac{1}{\sqrt{3,11 \cdot 10^5}} \approx 1,8 \cdot 10^{-3}.$$

Zur Abschätzung der durch Spannungs- und Temperaturfluktuationen verursachten Intensitätsschwankungen wird auf die Gleichungen (4.1) und (4.2) (siehe auch 3.4.2) zurückgegriffen. Diese beschreiben die vom Hersteller angegebene Abhängigkeit der Intensität von der Temperatur und Spannung. Für die Abschätzung wird davon ausgegangen, dass die Beziehung zwischen Intensität und Spannung unabhängig von der Umgebungstemperatur und die zwischen Intensität und Temperatur unabhängig von der anliegenden Spannung ist.

$$\frac{I_T}{I_{25^\circ C}} = -0,0031 \frac{T}{^\circ C} + 1,0708 \quad (4.1)$$

$$\frac{I_U}{I_{3,6V}} = 0,4045 \cdot \left( \frac{U}{V} \right)^2 - 1,1632 \cdot \frac{U}{V} - 0,0314 \quad (4.2)$$

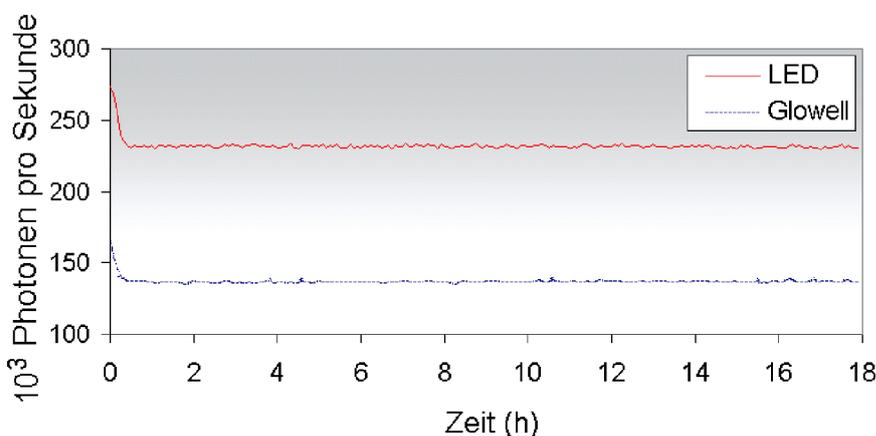
Die Spannungsreferenz, an welche die LED angeschlossen wurde, lieferte eine Spannung von  $3\text{ V} \pm 47\text{ }\mu\text{V}$ . Die Temperatur konnte auf  $20\text{ }^\circ\text{C}$  mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,01\text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt werden. Für die relativen Abweichungen ergibt sich aus obigen Gleichungen:

$$\frac{\Delta I_T}{I_{25^\circ\text{C}}} = \frac{I_{19,99^\circ\text{C}}}{I_{25^\circ\text{C}}} - \frac{I_{20,01^\circ\text{C}}}{I_{25^\circ\text{C}}} = 6,2 \cdot 10^{-5}$$

$$\frac{\Delta I_U}{I_{3,6\text{V}}} = \frac{I_{3,000047\text{V}}}{I_{3,6\text{V}}} - \frac{I_{2,999953\text{V}}}{I_{3,6\text{V}}} = 1,2 \cdot 10^{-4}$$

Die Schwankungen aufgrund von Temperatur- und Spannungsschwankungen sind im Vergleich zum Photonenrauschen sehr gering. Insgesamt ergibt sich eine relative Intensitätsschwankung von  $1,98 \cdot 10^{-3}$ .

Zur experimentellen Untersuchung der Intensitätskonstanz wurde das Phantom mit den Filtern FG13 und NG10 im Dunkelraum der NightOWL platziert. Um auszuschließen, dass es einen unbekanntem Einflussfaktor gab, der gleichermaßen auf den CCD-Chip und das Phantom einwirkte, wurde neben dem Phantom der Glowell-Standard mit dem für diesen angefertigten Filter platziert. Über einen Zeitraum von 18 Stunden wurde alle fünf Minuten eine Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 120 s gemacht. In den ersten zwanzig Minuten fiel die Intensität beider Lichtquellen stark ab (Abbildung 32). Da dieser Abfall bei beiden Lichtquellen auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass er durch die NightOWL verursacht wurde. Für die Aufnahmen ab 20 Minuten nach Start der Messreihe wurden der Helligkeitsmittelwert und die Standardabweichung von den vom Phantom und dem Glowell-Standard ausgeleuchteten Bereichen bestimmt. Es ergab sich eine relative Intensitätsschwankung von  $4,8 \cdot 10^{-3}$  für den Glowell-Standard und von  $3,7 \cdot 10^{-3}$  für das Phantom. Dies stimmt mit der theoretischen Abschätzung der Intensitätsschwankung überein.



**Abbildung 32**

Verlauf der Intensität der LED nach Einschalten des Temperaturkontrollsystems im Vergleich zum gefilterten Glowell-Standard anhand einer Messung mit der NightOWL.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bewertung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen zur Konstruktion eines Kalibrierphantoms für die optische Bildgebung am Rattenkopf erarbeitet. An eine Kalibrierlichtquelle für Photonen zählende Kameras werden hohe Anforderungen gestellt. Sie soll zugleich eine extrem geringe und zeitlich konstante Intensität aufweisen. Bisher wurden zu diesem Zweck radioaktive Materialien (meist Tritium) in Kombination mit phosphoreszierenden Stoffen verwendet, bei denen die Intensität von keinen äußeren Einflüssen abhängt. Wegen der Radioaktivität können solche Lichtquellen nicht von allen Laboren verwendet werden. Die geringe Halbwertszeit der verwendeten Materialien limitiert außerdem die Lebensdauer einer radioaktiven Lichtquelle. Anstatt einer radioaktiven Lichtquelle wurde in dieser Arbeit eine LED als Kalibrierlichtquelle verwendet, die mit verschiedenen Filtern kombiniert etwa 300.000 Photonen pro Sekunde lieferte. Intensitätsschwankungen aufgrund von Temperatur- und Spannungsfluktuationen wurden durch die Verwendung eines Temperaturkontrollsystems und einer Präzisions-Spannungsquelle so stark reduziert, dass sie im Vergleich zum Photonenrauschen vernachlässigbar waren. Insgesamt konnte die Intensität mit einer Genauigkeit von 2 ‰ eingestellt werden, wobei 1,8 ‰ durch das Photonenrauschen verursacht wurden, welches den Prozess der Lichtemission immer begleitet und daher nicht reduziert werden kann. Abhängig von der Temperatur (und damit vom Strom) nimmt die Intensität einer LED mit der Betriebsdauer ab. Bei einem Strom von 10 mA und einer Temperatur von 40 °C beträgt die Intensität nach 400 Stunden noch 99 % des Anfangswertes [5]. In dem in dieser Arbeit entwickelten Kalibrierphantom betrug der LED-Strom 2,5 mA und die Temperatur 20 °C. Die Betriebsdauer, nach der die Intensität auf 99 % des Anfangswertes abgefallen ist, liegt bei diesen Bedingungen vermutlich deutlich über 400 Stunden. Für eine gleichbleibende Intensität sollte die LED dennoch nach 400 Betriebsstunden ausgewechselt werden.

Um das Phantom eines Rattenkopfes bauen zu können, wurden dessen optische Eigenschaften aus Literaturangaben abgeschätzt. Dazu wurde das von van der Zee ermittelte Absorptionsspektrum von Rattenhirn [36] und das von Gebhart et al. ermittelte Streuspektrum von menschlicher grauer Hirnmasse [14] zugrunde gelegt. Die Angaben von optischen Gewebeeigenschaften sind generell kritisch zu beurteilen, da zurzeit kein Standardverfahren zu ihrer Ermittlung existiert und die von verschiedenen Autoren angegebenen Werte für das gleiche Gewebe um bis zu zwei Größenordnungen voneinander abweichen [3]. Außerdem kann nicht davon ausgegangen werden, dass die am toten Tier erhobenen Spektren die optischen Eigenschaften des Gehirns einer lebenden, narkotisierten Ratte nach einem Schlaganfall wiedergeben. Weiterhin sei hier angemerkt, dass zwar ein Großteil des Volumens des Rattenkopfes vom Rattenhirn ausgemacht wird, die Absorption und Streuung durch den Schädelknochen und das weiße Fell jedoch nicht zu vernachlässigen sind. Auch dass biologisches Gewebe nicht homogen ist, stellt eine Abweichung zu dem Phantom dar, das in dieser Arbeit hergestellt wurde.

Ausgehend vom oben genannten Absorptions- und Streuspektrum wurden die optischen Eigenschaften des Rattenhirns im Wellenlängenbereich von 500 – 800 nm durch eine Mischung aus Epoxidharz,  $\text{TiO}_2$  und zwei Harzfarbstoffen nachgebildet. Die Absorption der Phantome wurde an Phantomproben ohne zugesetztes Streumedium vermessen. Die Messung des Absorptionsspektrums der Phantome selbst war nicht möglich, da die Gesamtschwächung bei diesen maßgeblich von der Streuung bestimmt wurde. Eine Differenzierung zwischen den Effekten von Absorption und Streuung war mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich.

Der Absorptionskoeffizient fiel nach Ansetzen der Phantomproben kontinuierlich ab und war nach etwa drei Wochen stabil. Nach diesem Zeitraum wies das Absorptionsspektrum im gesamten Wellenlängenbereich Werte auf, die um 0,02/mm – 0,04/mm kleiner als im Rattenhirn waren. Der dadurch verursachte relative Fehler betrug unterhalb von 630 nm bis zu 20 %, oberhalb von 630 nm lag er bei über 80 %. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Farbstoffe oberhalb von 630 nm fast keine Absorption aufwiesen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Angaben der optischen Eigenschaften von biologischen Geweben mit Fehlern von bis zu zwei Größenordnungen behaftet sind, ist eine Abweichung von 20 % vernachlässigbar. Oberhalb von 630 nm sind die Phantome jedoch nicht zur Simulation des Rattenhirns geeignet.

Das Streuspektrum der Phantome wurde mangels geeigneter Messapparatur anhand von Literaturwerten bestimmt [40]. Das Streuspektrum von  $\text{TiO}_2$  in Epoxidharz zeigt einen anderen Verlauf als das von Rattenhirn, der Streukoeffizient fällt jedoch bei beiden mit steigender Wellenlänge ab (Abbildung 26). Der Streukoeffizient der Phantome betrug bei 700 nm genau wie der von Rattenhirn 0,9 / mm. Im Bereich von 500 – 600 nm wurde das Streuspektrum von Willmann [40] nicht ermittelt und ist daher auch für die Phantome unbekannt.

Die lumineszierenden Stammzellen wurden durch eine Diffusionskugel simuliert, deren Abstrahlcharakteristik im vorderen Halbraum annähernd isotrop war. Des Weiteren sollten die Stammzellen hinsichtlich ihres Emissionsspektrums und ihrer Intensität nachgeahmt werden. Dazu wurde die Intensität von 100.000 Zellen bestimmt, die sich in einer Petrischale befanden. Die Petrischale reflektierte einen Teil des nach unten abgestrahlten Lichts. Der mit der NightOWL bestimmte Intensitätswert unterschätzt die tatsächlich emittierte Intensität, da bei der Berechnung von dem Grenzfall vollständiger Reflexion des nach unten abgestrahlten Lichts ausgegangen wird (siehe 3.2.3). Andererseits wird die Intensität des Lichts, das von den ins Rattenhirn implantierten Zellen emittiert wird, mit dem in-vitro gemessenen Intensitätswert möglicherweise überschätzt, da die Blut-Hirn-Schranke die Aufnahme des Luziferins erschwert. Mangels genauer Kenntnis der so verursachten Abweichung wurde dennoch der in-vitro gemessene Wert als Näherung für die in-vivo emittierte Lichtmenge herangezogen.

Durch die Verwendung verschiedener Neutralgraufilter konnte die Intensität der LED variiert werden. Mit den Filtern NG10 und FG13 wurde eine Intensität erzielt, die etwa 310.000 lumineszierenden Stammzellen entsprach. Das so gefilterte LED-Licht wurde in den Diffusor eingekoppelt und wies ein Maximum bei 640 nm auf. Die Halbwertsbreite betrug 160 nm (siehe 3.4.4). Dabei war es aufgrund der geringen Intensität nicht möglich, das Spektrum hinter dem Diffusor zu messen. Wie dessen Absorption sich auf das Spektrum auswirkt, bleibt daher unbekannt. Das Emissionsmaximum der Stammzellen liegt bei 612 nm, die Halbwertsbreite beträgt 90 nm [44]. Die Abweichung des gefilterten LED-Spektrums vom Biolumineszenz-Spektrum wurde durch die wellenlängenabhängige Absorption der Neutralgraufilter verursacht. Zur Simulation der Stammzellen wäre ein weiterer Filter nötig, das das Maximum um 30 nm verschiebt und die Halbwertsbreite verringert.

## 5.2 Ausblick

Für die systematische Untersuchung des Einflusses von Dicke des abschwächenden Materials und der Intensität der Lichtquelle auf das Signal ist eine Weiterentwicklung des in dieser Arbeit hergestellten Kalibrierphantoms von Interesse.

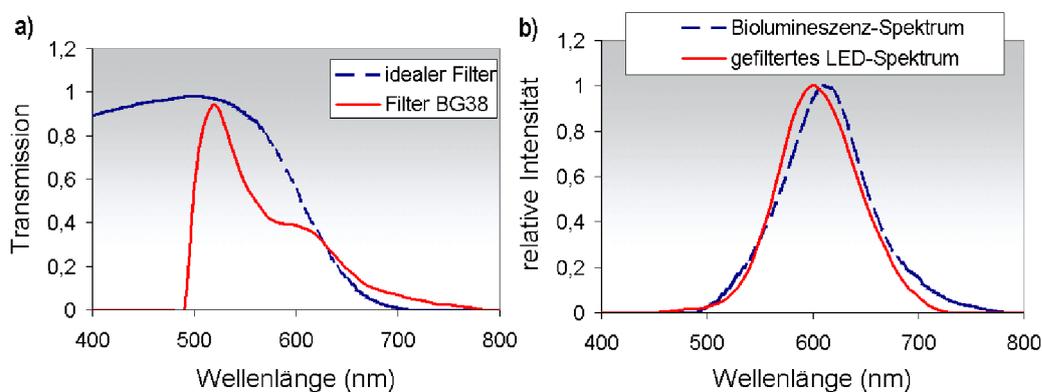
Dazu sollten das Absorptions- und das Streuspektrum des Rattenhirns gemessen werden. Indem anschließend die Phantome mit demselben Verfahren vermessen werden, wäre es möglich die eingestellten Eigenschaften direkt mit denen des Rattenhirns zu vergleichen. Dadurch würde auch die Frage nach dem Verlauf des Streuspektrums der Phantome zwischen 500 und 600 nm geklärt. Das Absorptionsspektrum der Phantome konnte nur näherungsweise bestimmt werden, da den zu diesem Zweck angefertigten Phantomproben kein Streumedium zugefügt wurde. Die Anwesenheit von Streupartikeln kann jedoch einen Einfluss auf das Absorptionsspektrum haben (siehe 2.5). Das in dieser Arbeit als Streumedium verwendete  $\text{TiO}_2$  nähert den spektralen Verlauf des Streuspektrums von Rattenhirn vermutlich nur grob an. Bei einer Weiterentwicklung der Phantome sollte ein Streumedium gesucht werden, das zur Simulation der Streuung des Rattenhirns besser geeignet ist.

Eine Weiterentwicklung des Phantoms würde auch die Verbesserung der Abstrahlcharakteristik des Diffusors beinhalten. Dazu sollten Diffusionskugeln mit variierendem Anteil an  $\text{TiO}_2$  hergestellt werden. Ein weiterer Schritt wäre die Quantifizierung des vom Diffusor transmittierten Lichtstroms (Strahlungsenergie pro Zeiteinheit) bei verschiedenen Filterkombinationen. Dadurch wird das Kalibrieren eines Luminometers ermöglicht, so dass Aufnahmen messtechnisch ausgewertet werden können.

Das Emissionsspektrum der Luziferase  $\text{Fluc}^+$  wurde aus Literaturdaten entnommen [44]. Nach diesen Angaben liegt das Emissionsmaximum bei einer Temperatur von 37 °C bei 612 nm. Im Rahmen einer vorläufigen Untersuchung wurde das Emissionsspektrum der lumineszierenden Stammzellen gemessen, indem diese lysiert (Zerstörung der Zellmembran) und das Lysat auf eine Temperatur von 37 °C gebracht wurde. Obwohl die Stammzellen die Luziferase  $\text{Fluc}^+$  exprimieren, ergab die Messung ein Emissionsmaximum bei 525 nm. Möglicherweise wurde die Abweichung von den Literaturdaten durch eine Abweichung des pH-Wert des Lysats von dem In-vivo-Wert verursacht. Da Fehler im Untersuchungsablauf nicht ausgeschlossen werden können, wurde in dieser Arbeit auf Literaturwerte zurückgegriffen. Zur Klärung

dieses Punktes sollten allerdings weitere Untersuchungen des Emissionsspektrums der lumineszierenden Stammzellen durchgeführt werden.

Um mit dem Phantom die lumineszierenden Stammzellen spektral nachzuahmen, wird ein weiterer Filter benötigt. In Abbildung 33 a) ist der spektrale Verlauf eines idealen Filters für diesen Zweck abgebildet. Dieser Verlauf wurde durch Berechnung der Differenz des Biolumineszenz- und des mit den Filtern FG13 und NG10 gefilterten LED-Spektrums berechnet. Zum Vergleich ist das Transmissionsspektrum des Filters BG38 (Reichmann Feinoptik,  $d = 2$  mm) abgebildet, mit dem das in Abbildung 33 b) dargestellte Spektrum erzielt werden kann.



**Abbildung 33**

(a) Transmissionsspektrum eines idealen Filters zur Annäherung des Biolumineszenzspektrums durch die LED und Transmissionsspektrum des Filters BG38 (rekonstruiert aus einer graphischen Darstellung des Herstellers).  
 (b) Spektrum der mit den Filtern FG13, NG10 und BG38 gefilterten LED

### 5.3 Fazit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Kalibrier-Phantoms, dessen optische Eigenschaften denen des Rattenhirns und der biolumineszierenden Stammzellen entsprechen.

Die optischen Eigenschaften des Rattenhirns wurden anhand von Literaturdaten abgeschätzt und mit Epoxidharz, Farbstoffen und einem Streumedium nachgebildet. Eine LED und verschiedene Filter dienten zur Simulation der lumineszierenden Stammzellen. Der Lichtstrom der LED wies eine hohe Konstanz auf, so dass die LED sich als Kalibrierlichtquelle für eine CCD-Kamera eignet.

Für die Kalibrierfunktion des Phantoms sollte im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten der von ihm abgestrahlte Lichtstrom quantifiziert werden. Des Weiteren sollten das Absorptions- und Streuspektrum des Rattenhirns und des Phantoms vermessen werden. Das Emissionsspektrum des Phantoms könnte durch einen zusätzlichen Filter dem der biolumineszierenden Stammzellen angenähert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Chance B, Leigh JS, Miyake H, Smith DS, Nioka S, et al. (1988). Comparison of time-resolved and -unresolved measurements of deoxyhemoglobin in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 4971-4975
- [2] Chaudhari AJ, Darvas F, Bading JR, Moats RA, Conti PS, et al. (2005). Hyperspectral and multispectral bioluminescence optical tomography for small animal imaging. *Physics in medicine and biology* 50: 5421-5441
- [3] Cheong WF, Prah SA and Welch AJ (1990). A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE journal of quantum electronics* 26: 2166-2185
- [4] Cubeddu R, Pifferi A, Taroni P, Torricelli A and Valentini G (1997). A solid tissue phantom for photon migration studies. *Physics in medicine and biology* 42: 1971-1979
- [5] Curran JW and Peck JP (2006). Comparison of White LEDs. [www.dialight.com/index.cfm](http://www.dialight.com/index.cfm). 30.06.2006
- [6] Dehghani H, Davis SC, Jiang S, Pogue BW, Paulsen KD and Patterson MS (2006). Spectrally resolved bioluminescence optical tomography. *Optics letters* 31: 365-367
- [7] Driver I, Feather JW, King PR and Dawson JB (1989). The optical properties of aqueous suspensions of Intralipid, a fat emulsion. *Physics in medicine and biology* 34: 1927-1930
- [8] DuPont: *DuPont Ti-Pure R-960*. DuPont Titanium Technologies, Wilmington.

- [9] DuPont: *Polymers, light & the science of titanium dioxide*. DuPont Titanium Technologies, Wilmington.
- [10] Eggert HR and Blazek V (1987). Optical properties of human brain tissue, meninges, and brain tumors in the spectral range of 200 to 900 nm. *Neurosurgery* 21: 459-464
- [11] Firbank M, Oda M and Delpy DT (1995). An improved design for a stable and reproducible phantom material for use in near-infrared spectroscopy and imaging. *Physics in medicine and biology* 40: 955-961
- [12] Flock ST, Jacques SL, Wilson BC, Star WM and van Gemert MJ (1992). Optical properties of Intralipid: a phantom medium for light propagation studies. *Lasers in surgery and medicine* 12: 510-519
- [13] Furutsu K and Yamada Y (1994). Diffusion approximation for a dissipative random medium and the applications. *Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics* 50: 3634-3640
- [14] Gebhart SC, Lin WC and Mahadevan-Jansen A (2006). In vitro determination of normal and neoplastic human brain tissue optical properties using inverse adding-doubling. *Physics in medicine and biology* 51: 2011-2027
- [15] Gu X, Zhang Q, Larcom L and Jiang H (2004). Three-dimensional bioluminescence tomography with model-based reconstruction. *Optics express* 12: 3996-4000
- [16] Hebden JC, Hall DJ, Firbank M and Delpy DT (1995). Time-resolved optical imaging of a solid tissue-equivalent phantom. *Applied Optics* 34: 8038-8047
- [17] Ishimaru A (1989). Diffusion of light in turbid material. *Applied Optics* 28: 2210-2215
- [18] Kurth CD, Liu H, Thayer WS and Chance B (1995). A dynamic phantom brain model for near-infrared spectroscopy. *Physics in medicine and biology* 40: 2079-2092
- [19] Levitz D, Thrane L, Frosz MH, Andersen PE, Andersen CB, et al. (2004). Determination of optical scattering properties of highly-scattering media in optical coherence tomography images. *Optics express* 12: 249-259

- [20] Madsen SJ, Patterson MS and Wilson BC (1992). The use of India ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms. *Physics in medicine and biology* 37: 985-993
- [21] Moffitt T, Chen Y and Prahla SA. Preparation and characterization of polyurethane optical phantoms. *Unpublished Work*.
- [22] Nascimento do OF, Villaverde AB, Zangaro RA, Pacheco MTT and Durrant SF (2004). Optical Fiber Device and Biological Tissue Phantoms for Determination of Optical Parameters in the Near-Infrared Region. *Instrumentation science and technology* 32: 489–505
- [23] Owen T (2000). *Grundlagen der modernen UV-Vis-Spektroskopie*: Agilent Technologies
- [24] Peters VG, Wyman DR, Patterson MS and Frank GL (1990). Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared. *Physics in medicine and biology* 35: 1317-1334
- [25] Pickering JW, Moes CJM, Sterenborg HJCM, Prahla SA and van Gemert MJC (1992). Two integrating spheres with an intervening scattering sample. *Journal of the Optical Society of America* 9: 621-631
- [26] Predrotti F, Pedrotti L, Bausch W and Schmidt H (2002). *Optik für Ingenieure*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [27] Rao KP, Radhakrishnan S and Reddy MR (2006). Brain tissue phantoms for optical near infrared imaging. *Experimental brain research* 170: 433-437
- [28] Roggan A, Schäder D, Netz U, P. RJ, T. GC and Müller G (1999). The effect of preparation technique on the optical parameters of biological tissue. *Applied physics. B, Lasers and optics* 69: 445–453
- [29] Shangguan H, Prahla SA, Jacques SL, Casperson LW and Gregory KW (1998). *Pressure effects on soft tissues monitored by changes in tissue optical properties*. Presented at Laser-Tissue Interaction IX
- [30] Srinivasan R, Kumar D and Singh M (2002). Optical tissue-equivalent phantoms for medical imaging. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 15: 42-47

- [31] Star WM, ed. (1995). *Diffusion theory of light transport*, In: Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. New York: Plenum Press
- [32] Star WM (1997). Light dosimetry in vivo. *Physics in medicine and biology* 42: 763-787
- [33] Sterenborg HJCM, Van Gemert MJC, Kamphorst W, Wolbers JG and Hogervorst W (1989). The spectral dependence of the optical properties of human brain. *Lasers in medical science* 4: 221 – 227
- [34] Sukowski U, Schubert F, Grosenick D and Rinneberg H (1996). Preparation of solid phantoms with defined scattering and absorption properties for optical tomography. *Physics in medicine and biology* 41: 1823-1844
- [35] Technologies B: *Operating Manual NightOWL LB981*. Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland.
- [36] van der Zee P (1992). *Measurement and modelling of the optical properties of human tissue in the near infrared*. Dissertation. University College London
- [37] van der Zee P, Essenpreis M and Delpy DT (1993). *Photon Migration and Imaging in Random Media and Tissues*. Presented at Optical Tomography, Photon Migration, and Spectroscopy of Tissue and Model Media: Theory, Human Studies, and Instrumentation
- [38] van Staveren HJ, Moes CJM, van Marle J, Prahl SA and van Gemert MJC (1991). Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400–1100 nm. *Applied Optics* 30: 4507–4514
- [39] Wagnieres G, Cheng S, Zellweger M, Utke N, Braichotte D, et al. (1997). An optical phantom with tissue-like properties in the visible for use in PDT and fluorescence spectroscopy. *Physics in medicine and biology* 42: 1415-1426
- [40] Willmann S (1999). *Streulichtspektroskopie mit Hilfe von Photonendichtewellen*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [41] Yaroslavsky AN, Schulze PC, Yaroslavsky IV, Schober R, Ulrich F and Schwarzmaier HJ (2002). Optical properties of selected native and coagulated human

- brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Physics in medicine and biology* 47: 2059-2073
- [42] Yoo KM, Liu F and Alfano RR (1990). When does the diffusion approximation fail to describe photon transport in random media? *Physical Review Letters* 64: 2647-2650
- [43] Zeiss C: *Monolithic Miniature Spectrometer Product Information*. Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland.
- [44] Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW and Contag CH (2005). Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. *Journal of biomedical optics* 10: 412101-412109

# A Anhang

## A.1 Rohdaten

Auf der beiliegenden CD befinden sich die den Abbildungen dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten. In der Datei "Farbstoffproben.xls" sind die Absorptionsspektren der getesteten Farbstoffe bei verschiedenen Konzentrationen aufgeführt. Die Datei "Filter.xls" beinhaltet die aus den Herstellerangaben abgelesenen Transmissionswerte der Filter FG13 und NG10 sowie die gemessenen Transmissionswerte aller verwendeten Neutralgraufilter. In der Datei "LED.xls" befinden sich die Emissionsspektren der ungefilterten und der mit dem Filter FG13 gefilterten LED sowie den Darstellungen des Herstellers entnommene Daten. Die Datei "Intensitätskonstanz.xls" enthält die Meßdaten zur Intensitätskonstanz des Phantoms und des Glowell-Standards. In Literaturdaten.xls finden sich alle aus der Literatur gewonnenen Spektren. Die Absorptionsspektren, die an den final hergestellten Phantomproben erhoben wurden, sind in der Datei "Spektrum der Phantomproben.xls" zu finden.

## A.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit in dem gemeldeten Zeitraum ohne fremde Hilfe verfasst und mich keiner anderen als den angegebenen Hilfsmittel und Quellen bedient zu haben.

Köln, den 15.12.2006

Unterschrift

(Julia Scholzen)

### A.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PROF. DR. BLENDL, der die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und stets als Ansprechpartner zu Verfügung stand. Herrn PROF. DR HOEHN danke ich für sein Vertrauen, das mir die Möglichkeit gab, eigene Ideen auszuprobieren.

Ein hohes Maß an Unterstützung erfuhr ich von STEFAN WECKER, dem ich besonders herzlich danken möchte. Seine Diskussionsbereitschaft, Kreativität und Fähigkeiten bei der Konstruktion mechanischer Komponenten haben diese Arbeit sehr positiv bereichert.

Ein Dankeschön auch an BERND RADERMACHER für die Unterstützung bei der Anfertigung elektronischer Schaltungen.

CORDULA STRECKER und KLAUS KRUTTWIG danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Umgang mit Stammzellen. KLAUS KRUTTWIG möchte ich auch für die Gesellschaft an zahlreichen arbeitsamen Wochenenden danken.

Darüber hinaus danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für neurologische Forschung für die freundliche Arbeitsatmosphäre: ANDREAS BEYRAU, MICHAEL DIEDENHOFEN, UWE HIMMELREICH, CARLES JUSTICIA MERCADER, FRANCOISE KIERDORF, PEDRO RAMOS CABRER, JÖRG SEEHAFFER, PETER SPIEGELBERG, CHRISTIANE SPRENGER, ULLA UHLENKÜKEN, DIRK WIEDERMANN. Die Zusammenarbeit mit ihnen hat mir – ebenso wie viele sportliche Pausen - große Freude bereitet.

Meiner Schwester ANJA möchte ich für die sorgfältige Überarbeitung dieses Manuskripts danken.

Meiner FAMILIE UND FREUNDEN danke ich für alle erdenklichen Formen der Unterstützung während der gesamten Studienzeit. Insbesondere danke ich meinem Freund SEBASTIAN, bei dem ich immer starken Rückhalt fand, für seine Geduld.