

Aus dem Institut für Biomedizinische Optik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Alfred Vogel

MIKROSKOPISCH OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE FÜR
DIE DARSTELLUNG VON MUKUSTRANSPORT

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Hinnerk Schulz-Hildebrandt
aus Neumünster

2018

1. Berichtstatter: Professor Dr. rer. nat. Gereon Hüttmann
2. Berichtstatter: Professor Dr. rer. nat. Floris Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26. November 2018

MIKROSKOPISCH OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE
FÜR DIE DARSTELLUNG VON MUKUSTRANSPORT

Hinnerk Schulz-Hildebrandt

Für meine Frau Bettina und unseren Sohn Johann Fedder

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krankheitsbild zystische Fibrose	2
1.2	Untersuchung des Mukustransportes im Tiermodell	3
1.2.1	Herausforderungen bei dem Design eines mOCT Aufbaus	6
1.3	Visualisierung von Mukustransport im Menschen	7
2	Grundlagen	9
2.1	Eigenschaften der Luftwege	9
2.1.1	Funktionelle Anatomie der Luftwege	9
2.1.2	Physiologie des respiratorischen Systems	11
2.2	Grundlagen der Optik	13
2.2.1	Grundlagen der Wellenoptik	13
2.2.2	Optische Kohärenztomographie	20
3	Material und Methoden	29
3.1	Mikroskopische OCT	29
3.1.1	Optischer Aufbau	29
3.1.2	Mechanischer Aufbau	31
3.2	Endomikroskopische OCT	32
3.2.1	Optischer Aufbau	32
3.2.2	Endoskop für die mOCT	33
3.3	Ansteuerung und Datenaufnahme	35
3.3.1	Ansteuerung	35
3.3.2	Datenakquisition	36
3.4	Datenauswertung	37
3.4.1	Datenprozessierung	37
3.5	Numerische Dispersionskorrektur	40
3.5.1	Dispersionskorrektur	40
3.6	Technische Charakterisierung	41
3.6.1	Bestimmung von Dynamik und Sensitivität	41
3.6.2	Bestimmung des Bildfeldes und der lateralen Auflösung	43
3.6.3	Bestimmung von Aberrationen im emOCT	44
3.6.4	Bestimmung der axialen Auflösung	45
3.7	Simulation der Bildentstehung	46
3.8	Messungen am Tiermodell	48
3.8.1	<i>Ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Messungen im Wildtyp	49

3.8.2	Tierstudie zur Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen	51
3.9	Messung an humanem Gewebe aus der Nase	52
3.9.1	<i>In Vivo</i> Messungen an der humanen Nase	52
4	Ergebnisse	55
4.1	Messung am Tiermodell	55
4.1.1	<i>Ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Messungen im Wildtyp	55
4.1.2	Studie zur Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen	64
4.2	Endomikroskopische OCT (emOCT)	71
4.2.1	Einfluss der Aberrationen auf die Bildentstehung der emOCT	71
4.2.2	emOCT in der humanen Nase	74
5	Diskussion	79
5.1	mOCT als mikroskopisches Verfahren	79
5.2	mOCT zur Darstellung von Mukustransport <i>ex vivo und in vivo</i>	81
5.2.1	<i>Ex vivo</i> Messungen an Maustrachea	81
5.2.2	Analyse der Transportmechanismen in der Maus	82
5.2.3	Tierstudie zur Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen	83
5.3	Klinische Translation: endoskopische mOCT	84
6	Ausblick	87
6.1	mOCT	87
6.2	emOCT	89
7	Zusammenfassung	91
	Literaturverzeichnis	93
	Abbildungsverzeichnis	101
A	Anhang	103
A.1	Visualisierungen	103
A.1.1	Visualisierung zu Abschnitt 4.1.1.2	103
A.1.2	Visualisierung zu Abschnitt 4.1.1.2	105
A.1.3	Visualisierung zu Abschnitt 4.1.1.2	106
A.2	Einzelauswertung CF-Studie	109
A.3	Publikationsliste	135
A.4	Lebenslauf	139

Glossar

A-Scan	Amplituden-Scan, Streuintensität in Abhängigkeit der Tiefe an einem Punkt
ASL	Airways Surface Liquid
B-Scans	Brighness-Scan, OCT-Schnittbild
CF	zystische Fibrose
emOCT	endomikroskopische optischen Kohärenztomographie
FD-OCT	Fourier Domain OCT
FFT	schnelle Fouriertransformation
FWHM	volle Halbwertsbreite
GRIN	Gradientenindex
GVD	Gruppengeschwindigkeits-Dispersion
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
IVM	Intravitalmikroskopie
MIP	Maximalintensitätsprojektion
mOCT	mikroskopisch optische Kohärenztomographie
NA	numerische Apertur
OCM	optische Kohärenzmikroskopie
OCT	Optische Kohärenz Tomographie
PCF	photonische Kristallfaser
PCL	periziliare Flüssigkeit
RCM	konfokale Reflektionsmikroskopie
RIN	relative spektrale Intensitätsrauschen
ROI	Auswertungsbereich (region of interest)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SPF	spezifisch pathogenfrei

SQL	Superkontinuum-Laser
TD-OCT	Time Domain OCT
WFM	Weitfeldmikroskope

1 Kapitel 1

1 Einleitung

Das gesamte Energiestoffwechsel-System des Menschen benötigt die Versorgung mit Sauerstoff. Um dies zu gewährleisten, müssen jeden Tag in der Lunge 10.000 Liter Luft ausgetauscht werden [1]. Mit jedem Atemzug gelangen somit auch Feinstäube, Bakterien und andere Partikel in die Lunge [2]. Bei einem gesunden Menschen gibt es Mechanismen, die dafür sorgen, dass die Schadstoffe ihren Weg wieder nach draußen finden. Hierzu werden diese in Mukus (Schleim) gebunden und aus der Trachea über den Larynx in den Ösophagus transportiert [3]. Eine große Rolle bei der Reinigung spielen die auf dem Epithel sitzenden Zilien [4]. Bei diesen handelt es sich um ca. 6 μm lange Härchen mit einem ungefähren Durchmesser von 1 μm . Die Zilien führen eine synchrone Schlagbewegung mit einer Frequenz von 10 – 20 Hz aus, durch welche der Mukus Richtung Larynx transportiert wird [5, 6]. Sie sind umgeben von einer 5–7 μm dicken, dünnflüssigen Schicht, der sogenannten periziliären Flüssigkeit (PCL), welche zusammen mit dem Mukus die Airways Surface Liquid (ASL) bildet [7].

Die am häufigsten genutzte Technologie zur Bestimmung der Zilienschlagfrequenz stellt dabei die Hochgeschwindigkeit-Weitfeld-Videomikroskopie dar [8, 9]. Mit einer Hochgeschwindigkeitskamera können durch Bürstenhistologie [10] entnommene menschliche Zilien tragende Zellen [11] oder tierische *ex vivo* Präparate [12] untersucht werden. Da dieses Verfahren eine Durchlichtbeleuchtung verwendet, ist die Translation dieser Methode auf *in vivo* Messungen unmöglich. Pionierarbeiten auf dem Gebiet der *in vivo* Visualisierung der Zilienbewegung leisteten Ricka et. al. [11] mit der Laser-Specklevarianz-Bildgebung [13]. Die Auflösung von einzelnen Zilien tragenden Epithelzellen ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Die Eignung der optischen Kohärenztomographie (OCT) [14] für die Quantifizierung des Zilienschlages wurde 2013 durch Liu et. al. demonstriert [15]. Durch eine hohe axiale Auflösung konnte die durch den Schlag induzierte axiale Bewegung in einem A-Scan direkt visualisiert werden. Weitere Arbeiten [16, 17] zeigten eine Detektion des Zilienschlages bei niedrigeren Auflösungen, wobei fast ausschließlich die Intensitätsvariation des OCT-Signals zur Bestimmung der zellulären Dynamik verwendet wurde. Neben der intensitätsbasierten Detektion besteht mit der OCT auch die Möglichkeit die Schlagfrequenz über die Auswertung des Dopplersignals zu bestimmen [18].

Der durch den Zilienschlag vermittelte Transport von Mukus und einzelnen Partikeln wurde ebenfalls ausführlich *ex vivo* und *in vitro* untersucht [19, 20, 6, 21]. Mittels der Hochgeschwindigkeit-Weitfeld-Videomikroskopie wurden dabei Transportgeschwindigkeiten zwischen 40 μm und 200 μm pro Sekunde gemessen [21]. Krankheiten z. B. die primäre ziliäre Dyskinesie, die mit keiner bzw. einer stark verminderten Zilienaktivität [22] verbunden sind, zeigen, dass die Reinigung der Lunge nicht allein mit dem

durch Zilien vermittelten Transport erfolgt. Andernfalls hätten die Betroffenen nicht eine weitgehend normale Lebenserwartung. Neben der mikroskopischen Aktivität der Zilien tragen auch makroskopische Transportprozesse wie die Atmung oder das Husten zur Reinigung der Lunge bei [4]. Dabei spielen die Form und Konsistenz des Mukus selbst eine entscheidende Rolle [4]. *Ex vivo* und *in vitro* Modelle stoßen bei einer umfangreichen Analyse des Schleimtransports an ihre Grenzen, weil die makroskopischen Mechanismen nicht abgebildet werden können. Dieses würde die vollständige Erhaltung des pulmonologischen Systems erfordern.

Es besteht daher bis heute keine einheitliche Vorstellung, wie genau die Reinigung der Lunge durch Mukustransport erfolgt und welchen Anteil die einzelnen Mechanismen daran haben [4].

Da eine detaillierte Kenntnis über den Transport einen wichtigen Beitrag bei der Diagnose oder Entwicklung von neuen Therapieformen leisten kann, wird intensiv an diesem Thema geforscht. Kürzlich wurde erstmalig von Donnelly et. al. [23] mit einem enormen technischen Aufwand Mukus- und Partikeltransport in einem lebenden Tier visualisiert. Dies erfolgte durch die Verwendung eines Synchrotron und der Talbot-Lau Röntgen-Interferometrie. Bei einem hohen technischen Aufwand ist das Bildfeld mit einer Größe von 1 mm x 1 mm recht klein und die Auflösung unzureichend, um valide Werte für die ASL zu erhalten.

Mit existierenden optischen Bildgebungsverfahren war es bisher nicht möglich, die erforderliche Auflösung und Bildgebungsgeschwindigkeit zu erreichen die es erlaubt, den Transport von Mukus in einem intakten Bronchialtrakt darzustellen. Dieses soll die vorliegende Arbeit verändern.

1.1 Krankheitsbild zystische Fibrose

Mukoviszidose (lat. mucus, „Schleim“; viscidus, „zäh“), auch zystische Fibrose (CF) genannt [24], ist eine Erkrankung, bei der eine Veränderung des Mukus zu einer Hemmung der mukoziliaren Reinigung führt [25]. Die Ursache der CF liegt in der Mutation im CFTR-Gen, welche autosomal-rezessiv vererbt wird. Die Mutation führt zu einer Verminderung der Funktionsfähigkeit bzw. vollständiger Blockierung des Chloridkanals, des sogenannten Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulators (CFTR). Die Auswirkungen sind für den pulmonalen Trakt am gravierendsten, da die veränderten Eigenschaften des Schleims zu einer Störung des mukoziliaren Transports führen. Aufgrund der Störung kommt es zu vermehrten bakteriellen Infektionen, die den Bronchialtrakt schädigen. Durch intensive Forschung konnte die Therapie in den letzten 25 Jahren deutlich verbessert und die durchschnittliche Lebenserwartung stetig auf 40 Jahre gesteigert werden [26]. Ein Großteil der aktuellen medizinischen Forschung zur CF lag bisher im Bereich der Zellbiologie und Genomik. Gerade zu Beginn des 21. Jahrhunderts hat dies zweifelsohne zu einem ganz neuen Verständnis der Krankheit und der biologischen Prozesse im subzellulären Bereich geführt. Unter anderem konnten bisher mehr als 1900 verschiedene Mutationen des Gens identifiziert

werden [27].

Auch wenn jetzt die Frage nach den grundlegenden Ursachen der Mukus-Transportstörung geklärt ist, gibt es bis heute immer noch zwei konkurrierende Hypothesen, wie der Gendefekt zu einer Hemmung der mukoziliaren Reinigung führt. So geht ein Teil der Wissenschaftler davon aus, dass durch den Gendefekt die Abgabe von Chlorid-Ionen in das ASL massiv reduziert ist, was folglich durch Osmose ein Einwandern von Natrium-Ionen in das Epithel nach sich zieht und somit zum Austrocknen des Mukus führt [28]. Ein anderer Teil vertritt die Hypothese, dass die CFTR vermittelte Hydrogencarbonat-Sekretion (HCO_3^-) gestört ist, wodurch HCO_3^- extrazellulär nicht ausreichend zur Verfügung steht [29]. HCO_3^- ist für eine Entfaltung der Muzine, welche die strukturbildenden Bestandteile des Mukus darstellen, essenziell. Eine mangelnde Entfaltung führt zu einem hochviskosen, klebrigen Schleim, der nicht mehr ausreichend transportiert werden kann [29, 30]. Die Darstellung vom Mukustransport und seine Beeinflussung durch Therapeutika könnte einen großen Beitrag dazu leisten, das Verständnis über die Folgen des Gendefektes auf die Hemmung des mukoziliaren Transportes zu verbessern.

1.2 Untersuchung des Mukustransportes im Tiermodell

Für die Untersuchung von Störungen des Mukustransportes bei CF steht ein Mausmodell zur Verfügung, welches atemwegsbezogene Symptome dieser Erkrankung ausbildet. Dies wird durch eine Überexpression des epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) erreicht, welcher Natrium-Ionen aus dem Mukus entfernt und wie eine Störung des CFTR-Kanals zu einer Reduzierung der ASL, Erhöhung der Viskosität des Mukus und letztlich zu einer Hemmung des Mukustransportes führt [31]. Bisher konnte als Krankheitsparameter im Tiermodell nur die Überlebenszeit oder die Dicke der Mukusschicht *post mortem* gemessen werden. Die Dynamik des Mukustransportes ließ sich nicht direkt studieren.

In einer Langzeitstudie an CF-Patienten konnte eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion nach Gabe von isotoner Kochsalzlösung gegenüber hypertoner Kochsalzlösung gezeigt werden [32], ohne, dass der Mechanismus endgültig geklärt werden konnte. In dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, durch welche ein Einblick in den Mukustransport im lebenden Tier nach Applikation von Kochsalzlösung gegeben werden kann. Neben der Differenzierung von verschiedenen Transportmechanismen soll insbesondere untersucht werden, wie sich der Mukustransport in dem gegebenen CF-Mausmodell nach Gabe von hypertoner Kochsalzlösung verändert.

Aufgrund der Komplexität des Reinigungsprozesses der Lunge musste eine Bildgebungstechnologie gefunden werden, durch welche die relevanten Prozesse beobachtet werden können, ohne den Transport oder die Atmung zu blockieren. So sollte z. B. die spontane Atmung erhalten werden, während die Trachea weitgehend immobilisiert wurde. Die Atmung mit einer Frequenz in einem Bereich von 1 Hz bis 4,5 Hz [33, 34] und der Herzschlag mit ca. 5 Hz bis 14 Hz [35, 34] führen dabei zu einer globalen

Bewegung der Maus gegenüber dem Messsystem von bis zu 25 μm axial und 150 μm entlang der Trachea. Das Bildgebungssystem muss entsprechend schneller sein, um merkliche Bewegungsartefakte innerhalb eines B-Scans zu verhindern. Gleichzeitig wird eine Auflösung benötigt, mit der es möglich ist, sowohl zelluläre Strukturen als auch wenige Mikrometer feine Schichtungen, wie die ASL und Mukusdicke, zu visualisieren. Der Messbereich muss ausreichen, um die Mukusschicht (Dicke 200 μm) durch die intakte ca. 100 μm – 150 μm dicke Trachealwand hindurch beobachten zu können. Da nicht damit zu rechnen ist, dass die Reaktion auf Therapeutika sich innerhalb weniger Minuten entfaltet, muss zusätzlich gewährleistet sein, dass Messungen an der gleichen Stelle über mehrere Stunden möglich sind.

Fluoreszenz basierte Techniken wie die konfokale Mikroskopie [36] oder die Multiphotonenmikroskopie [37] sind zurzeit die meist genutzten Verfahren für die Intravitalmikroskopie (IVM) [38]. Für eine Untersuchung des Mukustransportes *in vivo* sind beide Methoden nur sehr eingeschränkt geeignet. Zum einen müsste der Mukus mit Fluorochromen gefärbt werden. Dies stellt prinzipiell einen Eingriff in das biologische System dar und ist insbesondere bei Langzeitmessungen durch photochemischen Schäden und Ausbleichen der Fluoreszenz limitiert [39, 40]. Eine weitere Limitierung ist insbesondere bei der Multiphotonenmikroskopie die geringe Bildgebungsgeschwindigkeit, die eine weitgehende Immobilisierung der Maus erfordern würde und schnelle Transportprozesse nicht darstellen kann. Diesen Limitierungen unterliegen nicht Methoden, die Streuung von Infrarotstrahlung im Gewebe zur Bildgebung nutzen. Kommerziell erhältlich sind hierfür zurzeit Weitfeldmikroskope (WFM) und konfokale Reflexionsmikroskope (RCM) [41]. Dabei scheidet die WFM, welche nur im Durchlichtverfahren sinnvoll genutzt werden kann, aus. Recht neue experimentelle Verfahren sind die OCT, die optische Kohärenzmikroskopie (OCM) und die μOCT . OCT/OCM und RCM erreichen dieselbe laterale Auflösung, welche umgekehrt proportional zur numerischen Apertur (NA) der verwendeten Optik und der Wellenlänge λ durch

$$\delta x = 0,37 \frac{\lambda}{NA} \quad (1.1)$$

gegeben ist [42, 43]. Signifikant unterscheiden sich beide Technologien in der Bildorientierung und der Tiefendiskriminierung. Die native Darstellung der RCM ist ein En-face-Bild, also ein zweidimensionales horizontales Schnittbild. Um dies zu erzeugen, wird eine Fläche abgerastert. Die Tiefendiskriminierung erfolgt durch die konfokale Beleuchtung und Detektion [44], welche das Licht, das außerhalb des Fokusbereichs gestreut wurde, effektiv dämpft. Die Tiefenauflösung ist durch die Länge des konfokalen Volumens ($\Delta z_{Konfokal}$) gegeben, das von der NA, der Wellenlänge und dem Brechungsindex n abhängt und durch

$$\Delta z_{Konfokal} = \frac{0,64\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (1.2)$$

gegeben ist [43].

Basierend auf der im Jahr 1987 von Youngquist et. al. [45] vorgestellten „low-

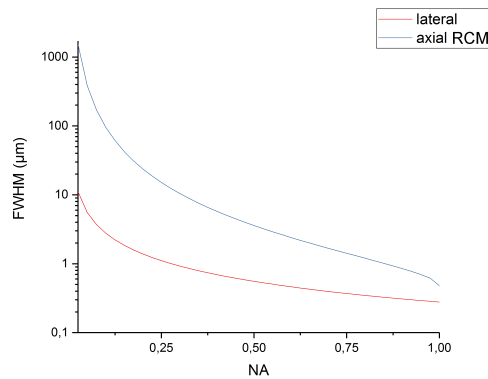


Abbildung 1.1: Gegenüberstellung der konfokalen axialen und lateralen Auflösungen eines hochauflösenden OCTs und der RCM

coherence reflectometry“ wurde die optische Kohärenztomographie erstmals 1991 durch Huang et. al. [14] als eine neue bildgebende Methode für biologisches Gewebe beschrieben. Bei der OCT handelt es sich um ein interferometrisches tomographisches Messverfahren. Die Tiefendiskriminierung erfolgt hier durch Interferenz breitbandiger Strahlung. Die Tiefenauflösung ist dabei durch die Länge des kohärenten Gatings ($\Delta z_{Kohärent}$) gegeben, welches der halben Kohärenzlänge der detektierbaren Strahlung entspricht und unabhängig von der verwendeten NA ist [46]. Bei der Verwendung einer Lichtquelle mit gaußförmigem Spektrum ist die Auflösung durch die Halbwertsbreite des kohärenten Gatings bei einer Zentralwellenlänge λ_0 und der spektralen Breite $\Delta\lambda$ der Lichtquelle durch

$$\Delta z_{Kohärent} = 2\ln(2) \frac{\lambda_0^2}{\pi\Delta\lambda} \quad (1.3)$$

gegeben. Mit Lichtquellen mit einigen hundert Nanometern Bandbreite können so axiale Auflösungen von 1 – 2 µm auch bei niedriger NA erreicht werden. Der Verlauf der räumlichen Auflösungen ist für eine Wellenlänge von 0,75 µm abhängig von der NA in Abbildung 1.1 dargestellt. Zelluläre Strukturen wie z. B. Epithelzellen werden bei einer Auflösung von ca. 2 µm sichtbar [47]. Diese Auflösung wird lateral mit einer NA von ca. 0,15 erreicht. Die axiale Auflösung beträgt für die RCM in diesem Fall 42 µm, was ungeeignet für die Darstellung von feinen axialen Strukturen ist. 2 µm Tiefenauflösung wird erst bei einer NA von fast 0,7 erreicht. Die OCT bietet 2 µm isotrope Auflösung zur Darstellung zellulärer Strukturen in En-face- und Schnittbildern schon bei kleinen NAs. Auch ist eine Tiefendiskriminierung durch Interferenz deutlich effektiver als die Tiefendiskriminierung durch den konfokalen Effekt [48].

Nativ werden mit der OCT vertikale Schnittbilder beim Abtasten einer Linie erzeugt, was sinnvoll für die Beurteilung von Schichten wie z. B. der ASL ist. Die OCT kann noch Reflektivitäten von 10^{-8} bis 10^{-11} (–80 dB bis über –110 dB) detektieren [49]. Dies hat zur Folge, dass der Tiefenmessbereich nicht primär durch die Länge des konfokalen Volumens begrenzt ist, sondern durch die Verschlechterung der lateralen

Auflösung außerhalb der Fokusebene. Zur Veranschaulichung dieser Limitierung zeigt Abbildung 1.2 eine OCT-Aufnahme einer Schilddrüse mit $1\ \mu\text{m}$ lateraler Auflösung. Nur in einem kleinen Bereich, deutlich sichtbar durch den hellen Streifen in der Bildmitte, werden feine Strukturen scharf abgebildet. Größere Strukturen, wie z. B. die Hohlräume und Schichtungen, sind aber auch weit außerhalb der Fokusebene noch gut sichtbar.

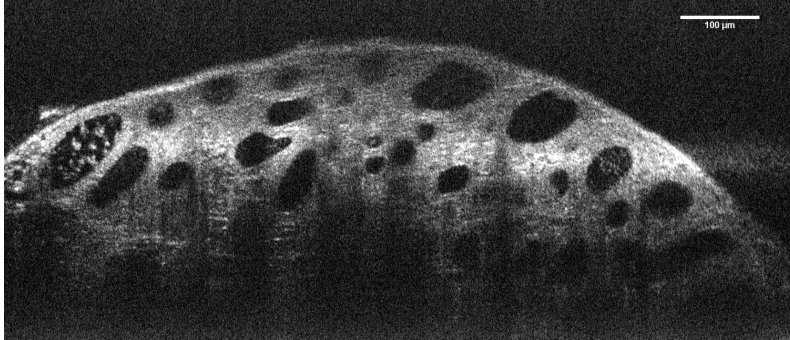


Abbildung 1.2: mOCT Aufnahme einer murinen Schilddrüse zur Demonstration der Bildentstehung unter dem Einfluss der konfokalen Tiefendiskriminierung.

Die OCT bieten für die Untersuchung von Mukustransport in der Maus, durch die Darstellung von Tiefenschnitten, einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber einer konfokalen Bildgebung. So wird immer die ganze Trachealwand dargestellt und kann zur Orientierung genutzt werden, auch wenn nur eine bestimmte Ebene, z. B. die Zilien, im Fokusbereich mit maximaler Auflösung abgebildet werden soll.

Für die Untersuchung von Mukustransport wurde daher, mit der mikroskopischen OCT (mOCT), ein Mikroskopieverfahren entwickelt, welches mit einer Auflösung besser als $2\ \mu\text{m}$ und einer Bildgebungs-Geschwindigkeit von bis zu 150 B-Scans pro Sekunde zur intravitalem Darstellung von Mukustransport geeignet ist.

1.2.1 Herausforderungen bei dem Design eines mOCT Aufbaus

Um eine hohe, nur durch die Bandbreite limitierte Tiefenauflösung auch praktisch zu erreichen, ist es notwendig, die Gruppenlaufzeit zwischen den beiden Interferometerarmen aufgrund von unterschiedlichen Komponenten exakt anzugleichen. Bei großen Bandbreiten spielt dabei auch die durch die Probe induzierte Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) eine entscheidende Rolle.

Eine unausgeglichene GVD zwischen den beiden Armen des Interferometers führt zu einer Abhängigkeit der Weglängendifferenz von der Wellenzahl [50]. In dem OCT-Bild stellt sich dies als eine Verbreiterung der axialen Strukturen und eine Verringerung der Signalamplitude dar. Für die Messungen in dieser Arbeit ist die Korrektur der GVD von besonderer Bedeutung, da die Auswirkung auf die Bildqualität mit zunehmender axialer Auflösung und mit kleineren Wellenlängen zunimmt. Das Problem der Dispersion kann durch mehrere Ansätze gelöst werden. Eine Möglichkeit ist

eine hardwaretechnische Kompensation. Zum Beispiel kann das Interferometer so aufgebaut werden, dass für den Referenz- und den Probenarm die gleichen optischen Komponenten verwendet werden, was als Linnik-Interferometer bezeichnet wird [51]. Ein weiterer Ansatz ist die Nutzung eines Common-Path-Interferometers [52]. Dabei wird auf einen externen Referenzarm verzichtet und das Probenlicht mit der Reflexion von einer reflektierenden Struktur, z. B. einem Deckglas, das über der Probe angebracht ist, zur Interferenz gebracht. Beide Ansätze sind nicht für den in dieser Arbeit entwickelten Aufbau sinnvoll, da sie die Flexibilität des Aufbaus einschränken und keine hardwaretechnische Lösung für die probeninhärenten GVD liefern, ohne deren Korrektur keine optimale Bildqualität erreicht werden kann. Der am häufigsten verwendete Ansatz besteht darin, die GVD durch Einbringen von Glassubstraten in den Referenzarm zu kompensieren [50]. Während diese Methode für klassische OCT Systeme sehr gute Ergebnisse liefert, müssen für hochauflösende Systeme mehrere Glassorten kombiniert werden, um befriedigende Ergebnisse zu erhalten [53]. Die erfolgversprechenste Möglichkeit, eine bandbreiten-limitierte axiale Auflösung von unter $2\ \mu\text{m}$ zu erreichen, liegt in der numerischen Kompensation der GVD. Die Herausforderung hierbei ist die Bestimmung des korrigierenden Phasenterms, welcher in der Regel über eine Polynomfunktion angenähert wird [54]. Verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung der Koeffizienten des Polynoms wurden demonstriert [55, 56, 57]. Aufgrund der großen Bandbreiten bei der mOCT sollte die probeninhärente Dispersion separat für verschiedene Teilbereiche kompensiert werden. Dies war bisher nur eingeschränkt möglich. In dieser Arbeit wurde daher ein Lösungsansatz gewählt, der die Dispersion durch Optimierung der Bildqualität bestimmt und dann numerisch korrigiert. So war es möglich, der probeninhärenten Dispersion Rechnung zu tragen und in einzelnen Bildbereichen eine optimale Bildqualität zu erhalten.

1.3 Visualisierung von Mukustransport im Menschen

Auch wenn durch die Tierstudien wertvolle Erkenntnisse über den Transport von Mukus gewonnen werden können, muss das eigentliche Ziel der Forschung der Mensch sein. Hierfür sollte eine Methode entwickelt werden, die eine Untersuchung von Mukustransport in den oberen Atemwegen des Menschen ermöglicht.

IVM hat eine ausreichende Auflösung und bietet im Gegensatz zur klassischen Histologie die Möglichkeit, auch dynamische Veränderungen und Prozesse, wie den Mukustransport im Menschen darzustellen. Für Organe, welche mit hochauflösenden Objektiven von außen erreicht werden können, wie beispielsweise die Augenoberfläche [58], die Haut [59] aber auch der Oto-Rhino-Laryngtrakt [60], wird die IVM bereits im klinischen Umfeld evaluiert. Für innere Körperoberflächen, wie z. B. dem Respirationstrakt, welcher nicht direkt optisch erreicht werden kann, muss auf endoskopische Ansätze zurückgegriffen werden. Mit dem Cellvizo (ManuaKea Technologies, Paris, Frankreich) ist ein auf Fluoreszenz basierendes konfokales Mikroskop kommerziell verfügbar. Derzeit beschränkt sich dessen Anwendung auf den wissenschaftlichen Bereich, wo es in einer Reihe von Disziplinen evaluiert wird [61, 62, 63].

Neben den Beschränkungen auf die Fluoreszenzbildgebung fehlt den eingesetzten Endomikroskopen aufgrund eines festen Fokusabstandes die Möglichkeit, systematisch verschiedene Tiefenebenen abzubilden, um zu einer volumetrischen Darstellung zu kommen. Die Erstellung von vertikalen Tiefenschnitten ist somit nicht möglich und die Anwendung im Wesentlichen auf die Darstellung von morphologischen Änderungen in einer Ebene limitiert. Gerade für die Beurteilung von Mukustransport ist die Tiefeninformation aber sehr wichtig, wie Studien am Tier gezeigt haben [64]. Im Bereich der Multiphotonenmikroskopie wurden von verschiedenen Gruppen ebenfalls endomikroskopische Sonden demonstriert und in der Forschung eingesetzt [65, 66, 67]. Aufgrund von möglichen photochemischen Schäden ist der Einsatz der MPM im Menschen außerhalb der Dermatologie zurzeit nur schwer vertretbar [39].

Die mikroskopische OCT bietet als marker-freies, volumetrisches Bildgebungsverfahren auch die Möglichkeit der endoskopischen Umsetzung mikroskopischer Auflösung. Allerdings wird die Bildgebung durch Bewegungsartefakte erschwert, welche durch die Handhabung des Endoskops verursacht werden. So kann die durch den natürlichen Tremor hervorgerufene Bewegung der Hand eine Amplitude von 10 μm ohne Belastung und zu mehr als 1000 μm bei Belastung im Frequenzbereich zwischen 10 Hz und 5 Hz [68] erreichen. Dies führt leicht dazu, dass die zu untersuchende Stelle aus dem Fokusvolumen geschoben oder unscharf abgebildet wird. Für die Quantifizierung von Mukustransport ist es wichtig, Strukturen verfolgen zu können, welche sich möglichst nicht durch Defokussierung verändern sollten. Eine Vergrößerung der Tiefenschärfe ist notwendig, um Bewegungen auszugleichen.

Hierfür wurden bereits diverse Verfahren entwickelt, entweder durch die Verwendung eines Besselstrahls [69], eines apodisierten Gaußstrahls [70] oder der Verwendung mehrerer Fokusse [71]. Jedes dieser Verfahren hat Nachteile in Bezug auf die Sensitivität, zusätzliches Rauschen oder die Aufnahmezeit. In einer eigenen Arbeit [72] konnte gezeigt werden, dass Aberrationen ebenfalls die Tiefenschärfe bei der OCT-Bildgebung mit hoher lateraler Auflösung vergrößern können.

In dieser Arbeit sollen sphärische und chromatische Aberrationen in einem hochauflösenden Endoskops für die Verlängerung des Fokus genutzt werden. Der Effekt auf die OCT-Bildgebung wird durch wellenoptische Simulation verifiziert. Die erfolgreiche Entwicklung eines starren, hochauflösenden Mikroskops ermöglicht die Translation der mOCT zur Intravital-Bildgebung der oberen Atemwege des Menschen. Für Anwendungen in der Klinik wurde der bildgebende Teil des Aufbaus, wie z. B. die bildgebende Optik und die Strahlableitung so weit miniaturisiert, dass dieser in einer Hand gehalten werden kann.

Zur Untersuchung der zellulären Dynamik in der humanen Mukosa wurde eine Gradientenindex (GRIN)-Optik für die endomikroskopische OCT (emOCT) mit erhöhter Schärfentiefe entwickelt und aufgebaut, die Querschnittsbilder von Schleimhautgewebe mit einer Auflösung von 1,25 μm liefert und dynamische Prozesse mit Geschwindigkeiten von bis zu 80 B-Scans pro Sekunde abbildet.

2 Kapitel 2

2 Grundlagen

2.1 Eigenschaften der Luftwege

Die Luftwege stellen die Verbindung zwischen der Lunge und dem Nasenrachenraum dar. Ihre primäre Funktion besteht in der Ventilation der Lunge, dem Diffusionssystem, welches für den Gasaustausch und somit für die Versorgung des Körpers mit Sauerstoff maßgeblich verantwortlich ist. Neben der ventilatorischen Funktion sind die Luftwege auch an der Reinigung des respiratorischen Systems von Fremdkörpern und Schadstoffen beteiligt. Verschiedene Krankheiten wie z. B. die zystische Fibrose können zu einer massiven Hemmung der Reinigungsvorgänge führen. Im folgenden Abschnitt wird eine Einführung in die Anatomie und Histologie der Luftwege sowohl bei Menschen als auch bei den für diese Arbeit besonders bedeutsamen Mäusen gegeben. Im Anschluss folgt eine Einführung in die Physiologie des ventilatorischen Systems.

2.1.1 Funktionelle Anatomie der Luftwege

Das respiratorische System von Säugetieren lässt sich nach seiner topographischen Lage in die oberen- und unteren Luftwege einteilen. In Abbildung 2.1 sind die wichtigsten Organe des respiratorischen Systems dargestellt [5].

2.1.1.1 Die oberen Luftwege beim Menschen

Zu den oberen Luftwegen gehört die Nase. Sie beginnt zwischen den Nasenlöchern (lat. *Nares*, Abb. 2.1-1) und endet im Nasenrachenraum (lat. *Choane*, Abb. 2.1-2). Die Nase lässt sich unterteilen in Nasenvorhof (lat. *Vestibulum nasi*, Abb. 2.1-3) und der Nasenhaupthöhle (lat. *Cavum nasi proprium*, Abb. 2.1-4). Der Nasenvorhof liegt direkt hinter den Nasenlöchern und ist mit mehrschichtig verhornten Plattenepithel ausgekleidet. Besetzt ist es mit Nasenhaaren, welche eine Barriere für größere Partikel darstellen. Die *Cavum nasi proprium* ist durch die Nasenscheidewand (lat. *Septum nasi*) in zwei separate Kompartimente (linke bzw. rechte Nasenhöhle) separiert. Im Gegensatz zu dem Nasenvorhof ist die Nasenhöhle mit einer besonderen Schleimhaut ausgestattet, dessen Epithel mit Zilien besetzt ist. An der lateralen Nasenwand befinden sich die drei Nasenmuscheln (lat. *Concha nasalis*), deren Lage mit den Zusätzen superior (Abb. 2.1-5) für die obere, media (Abb. 2.1-6) für die mittlere und inferior (Abb. 2.1-7) für die untere *Concha nasalis* gekennzeichnet ist. Den Abschluss der Nase und somit auch der oberen Luftwege bildet der Übergang in die Luftröhre (Trachea, Abb. 2.1-8) [5].

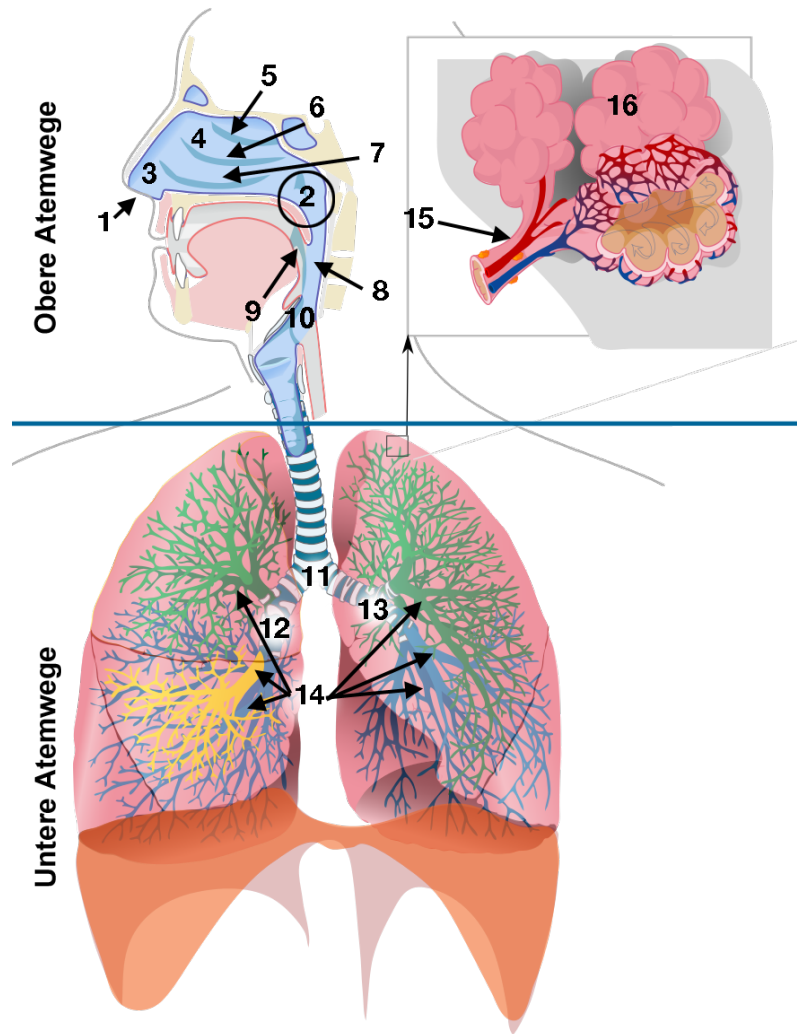


Abbildung 2.1: Schematische Abbildung des respiratorischen System, welches topographisch in die oberen und unteren Luftwege eingeteilt ist. Eine detaillierte Beschreibung ist im Text gegeben. Illustration genommen von Saint-Poll [73].

Ebenfalls den oberen Luftwegen zugerechnet wird der Mund, welcher mit einer Schleimhaut (mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel) ausgekleidet ist. Der Mundhöhle folgt in Richtung Lunge der Rachen (Pharynx, Abb. 2.1-9). Der Übergang zur Trachea bildet der Kehlkopf (Larynx, Abb. 2.1-10) [5].

2.1.1.2 Die unteren Luftwege beim Menschen

Der Übergang von Larynx in die Trachea bildet den Beginn der unteren Luftwege. Die Trachea hat einen Durchmesser von etwa 20 mm. Sie mündet an der Bifurkation (Abb. 2.1-11) in den rechten bzw. linken primären Bronchien (Abb. 2.1-12,13) und weist somit eine durchschnittliche Länge von 10-12 cm auf. Zur Stabilisierung während der Ventilation besteht sie aus einer Kombination von ventral gelegenen, hufeisenförmigen Knorpelspannen und Bindegewebe (lat. *Ligamentum anulare*). Dorsal grenzt sich die Trachea durch eine aus Bindegewebe bestehende Membran (lat. *Pariet membranaceus*) zur Speiseröhre ab. Das zum Lumen hin gerichtete Epithel ist mit Zilien und Becherzellen besetzt. Die Bronchien teilen sich im weiteren Verlauf weiter in die Bronchiolen (Abb. 2.1-14) auf. Den Übergang zu dem Diffusionssystem bilden die Alveolargänge (Abb. 2.1-15), welche die zum Gasaustausch vorhandenen Alveolen (Abb. 2.1-16) mit Luft versorgen [5].

2.1.1.3 Histologie des respiratorischen Epithels und der Trachealwand

Charakteristisch für die Luftwege ist die Auskleidung mit dem respiratorischen Epithel (Abb. 2.2). Dabei handelt es sich um ein mehrreihiges Epithel, welches im proximalen Bereich mit Zilien (ci) und Becherzellen (nicht in der Abbildung sichtbar) ausgestattet ist [5].

Bei den Zilien handelt es sich um ca. 10 µm lange Härchen mit einem Durchmesser von 1 µm, die am apikalen Zellpol angesetzt sind. Beim Menschen machen die Becherzellen ca. 15 % des Epithels aus. Im Trachealepithel der Maus sind sie dagegen kaum zu finden [74]. Bei den Becherzellen handelt es sich um einzellige Drüsen, die zusammen mit den in der Bindegewebsschicht, der *Lamina propria*, sitzenden seromukösen Drüsen den Mukus bilden. Die darauf folgende Schicht setzt sich aus Spangen, bestehend aus Knorpelzellen (ca), und der *Ligamentum anulare*, welche aus Elastin- und Kollagenfasern besteht, zusammen. Diese Schicht ist von Lymph- und Blutgefäßen (lv bzw. v) durchzogen [5].

2.1.2 Physiologie des respiratorischen Systems

2.1.2.1 Respiratorische Funktion der Nase

Die Nase erfüllt drei wichtige physiologische Funktionen. Die bekannteste ist hierbei die Geruchsempfindung (Olfaktion) [5]. Weit weniger ist bekannt, dass die Nase auch an der Geräuschbildung (Phonation) beteiligt ist, in dem diese einen Resonanzkörper bildet [5].

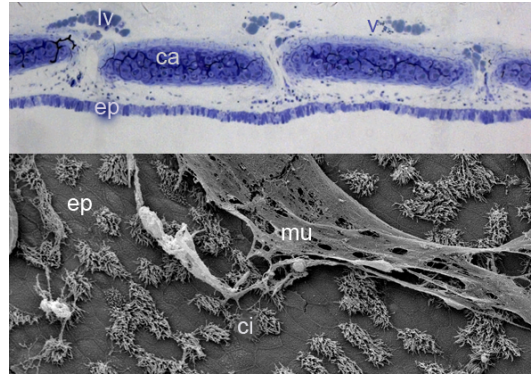


Abbildung 2.2: (a) Histologischer Schnitt einer Maustrachea. Sichtbar sind Epithelzellen (ep), Knorpelzellen (ca), Lymphgefäße (lv) und Blutgefäße. (b) Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme (*en face*) des zilierten Epithels mit den Epithelzellen (ep), den Zilien (ci) und Mukus (mu).

Für die in dieser Arbeit behandelten Themen ist allerdings nur die respiratorische Funktion der Nase von Bedeutung. In der Nase wird die Luft für den Gasaustausch vorbereitet. Dies beginnt damit, dass Luft an den im Nasenvorhof vorhandenen Nasenhaaren vorbeiströmen muss. Die Haare wirken dabei als erste Filterstufe, die größere Fremdkörper ($> 5 \mu\text{m}$ [1]) aus dem System fernhält. Die eingeatmete Luft strömt dann weiter in die Nasenhöhle. Hierbei muss die Luft auf dem Weg Richtung Trachea durch die Nasengänge an der Nasenmuschel vorbei. Diese ist durchzogen von einem dichten Kapillarnetz, welches zur Erwärmung der einströmenden Luft dient. Die mit Zilien besetzte Nasenschleimhaut sorgt dafür, dass kleinere Fremdkörper und Schadstoffe, welche in den Nasenmuscheln hängen bleiben, in den Rachenraum transportiert und im Verdauungstrakt unschädlich gemacht und ausgeschieden werden [5].

2.1.2.2 Respiratorische Funktion der Trachea

Die Trachea ist der Hauptluftweg, der die Lunge mit Luft versorgt und kann daher funktionell dem ventilatorischen System zugeordnet werden. Die Kombination aus Knorpelspannen und Bindegewebe verhindert, dass das Ein- bzw. Ausatmen die Trachea kollabieren lässt [5]. Eine weitere wichtige Aufgabe der Trachea ist der Abtransport von kleinen Fremdkörpern ($< 5 \mu\text{m}$ [1]) und Mukus aus den Bronchien und Alveolen. Der primäre Transportmechanismus nutzt die Zilien, um den Schleim gegen die Schwerkraft zum Rachen zu bewegen [4]. Die Zilien führen hierbei eine synchrone Schlagbewegung aus, wobei die Spitzen der Zilien beim Vorwärtsschlag über die ASL herausragen und somit den darauf befindlichen Mukus in eine gerichtete Bewegung versetzen. Die in dem Mukus gebundenen Fremdkörper werden damit über den Pharynx Gastrointestinaltrakt transportiert, wo diese dann vom Körper abgebaut werden können [5].

2.2 Grundlagen der Optik

2.2.1 Grundlagen der Wellenoptik

2.2.1.1 Licht als elektromagnetische Welle

Den sichtbaren Teil des elektromagnetischen Spektrums bezeichnet man als Licht. Eigenschaften und Ausbreitung von Licht sind durch die Maxwell'schen Gleichungen beschrieben, in denen in einem dielektrischen Medium die elektrische Ladungsdichte und elektrische Leitfähigkeit null gesetzt werden können. Damit sind die Maxwell'schen Gleichungen mit der elektrischen Feldstärke \mathbf{E} , der magnetischen Flussdichte \mathbf{B} und dem Nabla Operator ∇ durch

$$\begin{aligned} \nabla \times \mathbf{E} + \dot{\mathbf{B}} &= 0 & \nabla \cdot \mathbf{E} &= 0 \\ \nabla \times \mathbf{E} - \varepsilon \mu \dot{\mathbf{E}} &= 0 & \nabla \cdot \mathbf{B} &= 0 \end{aligned} \quad (2.1)$$

gegeben. Die elektrische Permeabilität ε und magnetische Permeabilität μ sind Materialparameter, welche für ein isotropes, homogenes Medium einen konstanten Wert besitzen. Die Ausbreitung von Licht wird mathematisch durch die Lösung der Maxwell'schen Gleichungen beschrieben. Eine der einfachsten Lösungen der Maxwell'schen Gleichung ist die sogenannte harmonische ebene Welle

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)}. \quad (2.2)$$

Hierbei bezeichnet \mathbf{E}_0 die Amplitude, \mathbf{r} den Beobachtungsort, t den Beobachtungzeitpunkt, ω die Kreisfrequenz und \mathbf{k} den Wellenzahlvektor, aus dessen drei Komponenten sich die Kreiswellenzahl

$$|\mathbf{k}| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2}. \quad (2.3)$$

ergibt.

Charakteristisch für eine harmonische Welle ist ihre Periodizität. Die Distanz zwischen zwei Punkten gleicher Phase bezeichnet man als Wellenlänge λ . Aufgrund der räumlichen Periodizität besteht folgender Zusammenhang zwischen der Wellenzahl k und der Wellenlänge λ

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}. \quad (2.4)$$

Die Frequenz ν und Kreisfrequenz ω sind mit der Wellenzahl k über die Lichtgeschwindigkeit (Phasengeschwindigkeit) c der monochromatischen Wellen verbunden

$$\omega = 2\pi\nu = ck. \quad (2.5)$$

Von besonderer Bedeutung ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht im Vakuum (Vakuumlichtgeschwindigkeit), sie ist definiert als

$$c_0 = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}} = 299792458 \frac{m}{s} \quad (2.6)$$

mit der Permittivität des Vakuums $\epsilon_0 = 8,854187817 \cdot 10^{-12} \text{As/Vm}$ und der Vakuumpermeabilität $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-6} \text{N/A}^2$. Die Lichtgeschwindigkeit in einem Medium ergibt sich aus der Vakuumlichtgeschwindigkeit, der relativen magnetischen Permeabilität μ_r und der relativen Permittivität ϵ_r zu

$$c = \frac{c_0}{\sqrt{\epsilon_r \mu_r}} = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \epsilon_r \mu_0 \mu_r}} = \frac{1}{\sqrt{\epsilon \mu}}. \quad (2.7)$$

ϵ_r und μ_r drücken hierbei die optischen Materialeigenschaften aus, welche ursächlich für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der elektromagnetischen Welle in verschiedenen Materialien sind. Aus ihnen ergibt sich der Brechungsindex

$$n = \frac{c_0}{c} = \sqrt{\epsilon_r \cdot \mu_r}. \quad (2.8)$$

In der klassischen Optik findet die Ausbreitung hauptsächlich in dielektrischen Materialien mit $\mu_r \approx 1$ statt. Daher ist es hinreichend den Brechungsindex als Variable der elektrischen Permeabilität zu betrachten $n \approx \sqrt{\epsilon_r}$.

Die Materialkonstanten sind im Allgemeinen von der Frequenz des eingestrahnten Lichtes abhängig. Daher besteht auch eine Abhängigkeit des Brechungsindex von der Frequenz $n = n(\nu)$, was als Dispersion bezeichnet wird. Für das sichtbare Spektrum und das nahe Infrarotspektrum liegt im Allgemeinen der Fall der normalen Dispersion vor. Dies bedeutet einen Anstieg des Brechungsindex mit steigender Frequenz ($dn/d\omega > 0$). Der Brechungsindex für blaues Licht ist also größer als der für rotes Licht.

Ein Wellenpaket, auch als optischer Puls bezeichnet, kann als Überlagerung von monochromatischen Wellen mit unterschiedlichen Frequenzen gedacht werden. Breitet sich nun solch ein Wellenpaket in einem dispersiven Medium aus, so führt die Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex zu unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten der einzelnen Frequenzanteile. Dabei kann man unterscheiden zwischen der Phasengeschwindigkeit und der Gruppengeschwindigkeit. Die Phasengeschwindigkeit beschreibt dabei die Ausbreitungsgeschwindigkeit gleicher Phasenzustände eines monochromatischen Anteils des Wellenpaketes. Breitet sich ein Wellenpaket in einem dispersiven Medium aus, so kommt es zu einer Phasendifferenz zwischen den einzelnen Frequenzen über die Zeit der Ausbreitung, was zu einer Verbreiterung des Wellenpaketes führt. Die Gruppengeschwindigkeit bezeichnet dabei die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Schwerpunktes der Einhüllenden des Wellenpaketes.

2.2.1.2 Bestrahlungsstärke

Mit heutigen Detektoren besteht nicht die Möglichkeit, die Amplitude einer elektromagnetischen Welle im optischen Spektrum zu beobachten. Vielmehr wird die in einer Lichtwelle enthaltene elektromagnetische Energie, die in einer bestimmten Zeit auf eine bestimmte Fläche trifft, gemessen. Diese Größe wird als Bestrahlungsstärke E_e oder im allgemeinen Sprachgebrauch auch synonym als Intensität bezeichnet. Die

Bestrahlungsstärke ist proportional zum Quadrat der Amplitude \mathbf{E}_0 des elektrischen Feldes

$$E_e = \frac{1}{2} \frac{c}{n} \epsilon_0 \mathbf{E}_0^2. \quad (2.9)$$

2.2.1.3 Interferenz

Interferenz bezeichnet die phasenstarre Überlagerung von zwei oder mehr elektromagnetischen Wellen. Dies führt in der Regel dazu, dass die Intensität der resultierenden Welle größer oder kleiner als die Summe der einzelnen Intensitäten ist. Um ein Interferenzmuster beobachten zu können, müssen die Wellen über den Beobachtungszeitraum kohärent (siehe 2.2.1.4) zueinander sein. In dieser Arbeit ist es ausreichend, sich auf die skalare Darstellung U des elektromagnetischen Feldes \mathbf{E} zu beschränken, welche aber zur Vereinfachung mathematischer Rechnungen komplex erweitert ist. Die Bestrahlungsstärke E_e ist dann proportional zum mittleren Betragsquadrat von U . Die komplexe Amplitude nach Überlagerung mehrerer Lichtwellenfelder ist nach dem Superpositionsprinzip durch

$$U(\mathbf{r}, t) = \sum_{n=1}^N U_n(\mathbf{r}, t) \quad (2.10)$$

gegeben. Im Folgenden sollen zwei, sich überlagernde Wellen U_1 und U_2 betrachtet werden. Nach 2.10 ergibt sich die für die komplexe Amplitude

$$U(\mathbf{r}, t) = U_1(\mathbf{r}, t) + U_2(\mathbf{r}, t). \quad (2.11)$$

Auf einem Detektor kann nun die zeitgemittelte Bestrahlungsstärke E_e beobachtet werden

$$E_e \sim \langle |U(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle = \langle |U_1(\mathbf{r}, t) + U_2(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle. \quad (2.12)$$

Durch das Ausmultiplizieren kann die Gleichung in drei physikalisch interpretierbare Terme separiert werden

$$E_e \sim \underbrace{\langle |U_1(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle}_a + \underbrace{\langle |U_2(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle}_b + \underbrace{2\text{Re}\{\langle U_1(\mathbf{r}, t) \cdot U_2^*(\mathbf{r}, t) \rangle\}}_c. \quad (2.13)$$

Die linearen Terme (a und b) beschreiben dabei eine zeitlich unabhängige Lichtverteilung, wohingegen der Interferenzterm (c) das Aussehen des räumlichen oder zeitlichen Interferenzmusters beschreibt.

Im Folgenden soll von der Annahme ausgegangen werden, dass eine Quelle die Welle $U_0(z, t)$ emittiert, welche mit einem Teilungsverhältnis von 50 : 50 in die zwei Sekundärwellen $U_1(z, t) = \frac{1}{2} U_0 e^{i(\mathbf{k}z - \omega t)}$ und $U_2(z, t) = \frac{1}{2} U_0 e^{i(\mathbf{k}z - \omega t)}$ aufgeteilt wird. Bevor beide Sekundärwellen auf einem Detektor wieder überlagert werden, läuft der eine Wellenzug die Strecke z_1 während der andere die Strecke z_2 zurücklegt. Für den Fall, dass die beiden Wellenzüge unterschiedlich lange Wege zurücklegen, kommt es

zu einem Gangunterschied, welcher mit der Weglängendifferenz $\Delta z = z_1 - z_2$ zu einer Zeitverzögerung

$$\tau = \frac{\Delta z}{c} \quad (2.14)$$

führt. Für den Interferenzterm (2.12) folgt

$$2\text{Re}\{U_1^* U_2\} = \langle |U_0|^2 \rangle \cdot \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} \Delta z\right) \quad (2.15)$$

und für die an dem Detektor gemessene Bestrahlungsstärke

$$E_e = \langle |U_0|^2 \rangle \left(1 + \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} \Delta z\right)\right). \quad (2.16)$$

Die Superposition von zwei elektromagnetischen Wellen mit einem Gangunterschied führt zu einem Interferenzmuster. Für den Fall, dass Δz einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge λ entspricht, wird die resultierende Amplitude maximal. Für einen zusätzlichen Gangunterschied einer halben Wellenlänge löschen sich die beiden Wellen aus, sodass die resultierende Bestrahlungsstärke null wird.

2.2.1.4 Kohärenz

Die Möglichkeit, ein Interferenzmuster zu beobachten, hängt stark von den Eigenschaften der Wellenfelder ab. Das Maß für deren Interferenzfähigkeit wird als Kohärenz bezeichnet und kann durch die Korrelationsfunktion quantifiziert werden. Im Folgenden sollen erneut die beiden Wellen U_1 und U_2 betrachtet werden. Für die komplexe Kreuzkorrelation folgt dann

$$\Gamma_{r_1 r_2}(\tau) = \langle U_1(\mathbf{r}_1, t) U_2^*(\mathbf{r}_2, t + \tau) \rangle. \quad (2.17)$$

Die Funktion beschreibt die Ähnlichkeit der Amplituden als Funktion der Zeit zwischen den beiden Sekundärwellen an den Ortspunkten r_1 und r_2 mit der zeitlichen Differenz Δt . Es wird von zeitlicher Kohärenz gesprochen, wenn die Betrachtung am gleichen Ort stattfindet ($r_1 = r_2$). Wenn keine zeitliche Differenz vorliegt ($\tau = 0$), dafür aber die Amplituden der Sekundärwellen an unterschiedlichen Orten korreliert sind, spricht man von räumlicher Kohärenz. Ein Maß für die Korrelation der beiden Wellenpakete ist durch die normierte raumzeitliche Kontrastfunktion gegeben als

$$\gamma_{r_1 r_2}(\tau) = \frac{\Gamma_{r_1 r_2}(\tau)}{\sqrt{\Gamma_{r_1 r_1}(\tau) + \Gamma_{r_2 r_2}(\tau)}}. \quad (2.18)$$

Die Extremwerte der Kontrastfunktion $\gamma_{r_1 r_2}(\tau) = 0$ bzw. $\gamma_{r_1 r_2}(\tau) = 1$ werden als vollständige Inkohärenz bzw. vollständige Kohärenz bezeichnet. Liegt der Wert dazwischen ($0 < \gamma_{r_1 r_2}(\tau) < 1$) so spricht man von partieller Kohärenz. Für diese Arbeit ist besonders die zeitliche Kohärenz von besonderer Bedeutung. Im Falle der

rein zeitlichen Kohärenz kann Gleichung 2.18 vereinfacht werden zu

$$\gamma(\tau) = \left| \frac{\Gamma(\tau)}{\Gamma(0)} \right|. \quad (2.19)$$

Die Zeitspanne τ , in der die Kontrastfunktion auf einen definierten Wert abgefallen ist, wird als Kohärenzzeit τ_c bezeichnet. Die Strecke l_k , welche die Lichtwelle in der Zeit τ_c zurücklegt, wird als Kohärenzlänge bezeichnet. Sie gibt die Weglängendifferenz an, bis zu der Interferenz mit gutem Kontrast beobachtbar ist

$$l_k = c \cdot t_k. \quad (2.20)$$

2.2.1.5 Spektrale Leistungsdichte

Die zeitliche Kohärenz ist durch das Leistungsspektrum der Strahlung bestimmt. Der Zusammenhang zwischen der zeitlichen Kohärenz und der spektralen Leistungsdichte wird durch das Wiener-Chintschin-Theorem beschrieben. Es besagt, dass die zeitliche Kohärenzfunktion, d. h. die Autokorrelierte des Wellenfeldes, durch die Fouriertransformation der spektralen Leistungsdichte gegeben ist

$$\Gamma(\tau) = \int S(\nu) e^{-i2\pi\nu\tau} d\nu. \quad (2.21)$$

Die Kohärenz von Licht wird maßgeblich durch seine Erzeugung bestimmt. Lichtquellen, deren Erzeugung von Licht auf der spontanen Emission basiert wie z. B. Glühlampen werden als klassische Lichtquellen bezeichnet. Das abgestrahlte Wellenpaket weist eine sehr geringe räumliche und zeitliche Kohärenz auf. Eine sehr hohe Kohärenz weisen Laserlichtquellen auf. Ihre Lichterzeugung basiert auf der induzierten Emission. Sie weist eine hohe räumliche und zeitliche Kohärenz auf. [75] Daneben existieren auch Lichtquellen wie z. B. die Superlumineszenzdiode (SLD), deren Lichterzeugung auf der Verstärkung von spontaner Emission basiert. Sie weisen im Allgemeinen eine hohe räumliche Kohärenz, aber nur eine geringe zeitliche Kohärenz auf. Eine weitere Lichtquelle mit einer hohen räumlichen und geringen zeitlichen Kohärenz ist die Superkontinuum-Lichtquelle, welche im folgenden näher erläutert werden soll.

2.2.1.6 Erzeugung eines Superkontinuums

Wird aus Laserlicht durch nicht-lineare Prozesse ein sehr ausgedehntes Spektrum von mehreren hundert Nanometern erzeugt, so wird dieses als Superkontinuum bezeichnet. Superkontinua entstehen durch Propagation eines Pulses eines Femto- oder Pikosekunden-Lasers in einem nichtlinearen Medium, indem der Brechungsindex von der Amplitude des elektromagnetischen Feldes abhängt. Als besonders effizient hat sich hierbei die Generierung des Superkontinuums in einer photonischen Kristallfaser (PCF) erwiesen, da diese durch ihre spezielle Dispersion die verschiedenen Spektralanteile in Phase hält und dadurch eine kohärente Verstärkung

ermöglicht. Selbstphasenmodulation, Vierwellenmischung und die stimulierte Anti-Stokes-Raman-Streuung sind dabei die dominierenden nichtlinearen Effekte. Die Erzeugung durch nichtlineare Effekte führt aufgrund von Puls zu Puls Variation zu einem hohen relativen Intensitätsrauschen (RIN) was in der OCT zu einer Reduzierung des Signal-Rausch-Verhältnisses führt [76].

Bei den in der OCT eingesetzten faserbasierten Superkontinuum-Lichtquellen wird das Licht über eine Singlemodefaser bereitgestellt. Daher ist eine hohe räumliche Kohärenz gegeben. Die zeitliche Kohärenz ist aufgrund der hohen spektralen Bandbreite hingegen sehr gering.

2.2.1.7 Fourieroptik

Die Ausbreitung von Licht kann mit Hilfe von Fourieranalysen erfolgen. Im Gegensatz zu Analysemethoden der technischen Optik die das Licht als einen Strahl beschreiben, berücksichtigt die Fourieroptik die Wellennatur des Lichtes.

Für die Beschreibung des Lichtes im Rahmen der Fourieroptik werden folgende Annahmen gemacht [75]:

- die Polarisation wird vernachlässigt
- das Medium sei quellenfrei und isotrop
- die Wirkung optischer Bauelemente auf die Lichtausbreitung ist auf eine Ebene senkrecht zur optischen Achse begrenzt (dünne optische Elemente)
- es werden nur stationäre optische Prozesse betrachtet

Die letzte Annahme führt dazu, dass die Zeitabhängigkeit des Wellenfeldes vernachlässigt wird, was zu der zeitunabhängigen Helmholtz-Gleichung führt, welche den Ausgangspunkt der Fourieroptik darstellt [75]

$$\Delta u(\mathbf{r}, \nu) + k^2 u(\mathbf{r}, \nu) = 0. \quad (2.22)$$

Eine Möglichkeit der Lösung zur Analyse der Lichtausbreitung ist die Winkelspektrum-Methode. Unter dem Winkelspektrum $\tilde{u}(k_x, k_y, k_z)$ versteht man die Zerlegung eines komplexen Wellenfeldes in ebene Wellen. Mathematisch kann dies durch eine Fouriertransformation des komplexen Lichtwellenfeldes ausgedrückt werden. Ein Wellenfeld $u(x, y, z)$ in einer beliebigen Ebene $z_0 = 0$ senkrecht zur optischen Achse (hier z-Achse) ist gegeben durch die Fouriersynthese

$$u(x, y, z_0) = \iint \tilde{u}(k_x, k_y, z_0) e^{i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (2.23)$$

mit den Raumkoordinaten x und y und den reziproken Koordinaten k_x und k_y . Die Propagation des Winkelspektrums entlang der optischen Achse kann durch Multiplikation des initialen Winkelspektrums mit dem Propagator $e^{ik_z z}$ berechnet werden. Für das Winkelspektrum folgt damit

$$\tilde{u}(k_x, k_y, z) = \tilde{u}(k_x, k_y, z_0) e^{ik_z z}. \quad (2.24)$$

Nach Propagation über die Entfernung z parallel zur optischen Achse ergibt sich das Wellenfeld dann als Fourier-Rücktransformation des propagierten Winkelspektrums [75]

$$u(x,y,z) = \iint \tilde{u}(k_x, k_y, z_0) e^{i(k_x x + k_y y + k_z z)} dk_x dk_y. \quad (2.25)$$

2.2.1.8 Optische Abbildung

Das Ziel der optischen Abbildung ist es, die von den verschiedenen Punkten des Objekts ausgehenden Elementarwellen durch ein optisches System exakt wieder zu Bildpunkten konvergieren zu lassen. Dabei ist die erreichbare Auflösung durch das vom optischen System übertragbare Winkelspektrum limitiert. Die Endlichkeit des freien Durchmessers (Apertur) des optischen Systems stellt mathematisch gesehen eine Tiefpassfilterung dar. Für den Fall, dass die Qualität der Abbildung nur durch die Beugung an der Apertur limitiert ist, wird von der beugungsbegrenzten Abbildung gesprochen. Die größtmögliche übertragbare Frequenz (ν_{cut}) der Objektstruktur ist dabei nicht nur durch das optische System, sondern auch durch die Kohärenzeigenschaften des Wellenfeldes gegeben. Unter der Annahme einer kleinen Apertur ist diese für den kohärenten Fall bei einem Aperturdurchmesser D und einer Gesamtbrennweite des optischen Systems f durch

$$\nu_{cut_{coherent}} = \frac{D}{2\lambda f} \quad (2.26)$$

gegeben. Im inkohärenten Fall ergibt sich

$$\nu_{cut_{incoherent}} = \frac{D}{\lambda f}. \quad (2.27)$$

Es ist ersichtlich, dass der Frequenzraum im kohärenten Fall nur halb so groß ist wie im inkohärenten Fall. Während die Übertragungsfunktion im kohärenten Fall durch eine Rechteckfunktion gegeben ist, die für alle Frequenzen optimalen Kontrast liefert, so ist diese im inkohärenten Fall durch die Autokorrelation einer Rechteckfunktion gegeben und liefert die höheren Raumfrequenzen auf Kosten einer Reduktion des Kontrasts [75].

Auch die Abbildung bzw. Bildentstehung unterscheidet sich für kohärente und inkohärente Bildgebung. Ausgangspunkt für die Betrachtung soll das Punktbild des Abbildungssystems darstellen. Es ist gegeben durch die Fouriertransformation der Pupillenfunktion p . Ist die Apertur eine kreisförmige Öffnung mit dem Radius a , für welchen $p(x,y) = 1$, für alle $\sqrt{x^2 + y^2} \leq a$ und sonst 0 gilt, ergibt sich die Pupillenfunktion als

$$\check{p}(x,y) = \frac{J\left(\sqrt{x^2 + y^2} \frac{2\pi D}{\lambda f}\right)}{\sqrt{x^2 + y^2} \frac{\pi D}{\lambda f}}. \quad (2.28)$$

Für ein ausgedehntes Objekt mit der Amplitudenreflektivität $r(x,y)$ kann die kohärente Bildentstehung mathematisch durch die Faltung von $r(x,y)$ mit dem Amplituden-Punktbild des Abbildungssystems beschrieben werden. Die komplexe Amplitude des Bildes ist dann gegeben durch

$$u(x,y) = \iint \tilde{p}(x,y) \cdot r(x' - x, y' - y) dx' dy'. \quad (2.29)$$

Die zeitgemittelte Bestrahlungsstärke kann nach Gleichung 2.9 durch

$$E_{e,coherent} = \left| \iint \check{p}(x,y) \cdot r(x' - x, y' - y) dx' dy' \right|^2 \quad (2.30)$$

angenähert werden. Die Faltung der komplexen Amplituden erzeugt im Intensitätsbild Interferenzen zwischen dem am Objekt gebeugten Licht. Dies ist auch der Grund, warum bei der Abbildung eine körnige Struktur entsteht, welche als Speckle bezeichnet wird. Deren Ursache ist die zufällige Phase, welche verschiedene Streuer innerhalb des Fokusvolumens dem Licht aufprägen [77].

Die inkohärente Bildentstehung wird mathematisch durch die Faltung des Betragsquadrates der Probenreflektivität $|r|^2$ mit dem betragsquadratierten Punktbild $|\tilde{p}|^2$ beschrieben. Interferenz hat dabei also keinen Einfluss auf die Bildentstehung. Für die zeitgemittelte Bestrahlungsstärke gilt [77]

$$E_{e,incoherent} = \iint |\check{p}(x,y)|^2 \cdot |r(x' - x, y' - y)|^2 dx' dy'. \quad (2.31)$$

2.2.2 Optische Kohärenztomographie

Basierend auf der im Jahr 1987 von Youngquist et. al. [45] beschriebenen „low-coherence reflectometry“ wurde 1991 die optische Kohärenztomographie als eine neue bildgebende Methode für biologisches Gewebe beschrieben [14]. Das heute als „Time-Domain“-OCT bezeichnete Bildgebungsprinzip weist eine große Ähnlichkeit zur Weißlichtinterferometrie [78] auf. Entscheidende Unterschiede sind die Verwendung einer räumlich kohärenten Lichtquelle und das Abrastern der Probe wie bei der Konfokalmikroskopie. Die Tiefeninformation wird durch Verfahren eines Spiegels im Referenzarm generiert. Interferenz zwischen Licht aus der Probe und dem Referenzlicht wird nur beobachtet, wenn die vom Referenzlicht zurückgelegte optische Weglänge mit der Weglänge des Lichtes aus der Probe innerhalb der Kohärenzlänge übereinstimmt. OCT-Geräte der zweiten Generation detektieren ein Interferogramm spektral aufgelöst und berechnen einen kompletten Tiefenscan (A-Scan) durch eine Fouriertransformation [46]. Dies geschieht entweder durch die Verwendung einer durchstimmbaren Lichtquelle, was als Swept-Source (SS)-OCT bezeichnet wird, oder – wie in dieser Arbeit – durch die spektrale Separation mittels eines Spektrometers (SD-OCT). Der Überbegriff zur Bezeichnung beider Verfahren ist die „Frequency-Domain“-OCT (FD-OCT).

2.2.2.1 Historischer Überblick der hochauflösenden OCT

Die klassische OCT deckt einen Auflösungsbereich von $4,5\ \mu\text{m}$ bis $15\ \mu\text{m}$ für die axiale Auflösung und $10\ \mu\text{m}$ bis $40\ \mu\text{m}$ für die laterale Auflösung ab. Damit können nur größere Gewebestrukturen und Gewebeschichtungen, aber keine zellulären Strukturen abgebildet werden. Im Folgenden soll ein historischer Überblick über die Entwicklung der OCT zu höherer Auflösung gegeben werden.

Bereits drei Jahre nach der ersten Veröffentlichung der OCT wurde von Izatt et. al. [48] die optische Kohärenzmikroskopie (OCM) demonstriert. Sie verwendet Mikroskopobjektive mit einer numerischen Apertur (NA) von mehr als 0,2 und stellt die Verbindung der optischen Kohärenztomographie mit der konfokalen Reflexionsmikroskopie dar. Die axiale Auflösung von $18\ \mu\text{m}$ gleicht des eines klassischen OCT-Systems. Es handelte sich um ein konfokales mikroskopisches Verfahren mit interferometrischer Detektion, bei dem pro Messung jeweils eine En-face-Ebene aufgenommen wird. Der Vorteil des OCM-Systems lag primär in der durch die heterodyne Verstärkung gegebenen höheren Sensitivität und besseren Unterdrückung außerhalb des Fokus gestreutem Licht gegenüber RCM, wodurch tiefer in das Gewebe gemessen werden konnte. Eine hohe mikroskopische Auflösung unter $2\ \mu\text{m}$ wurde erstmals im Jahr 1999 von Drexler et. al. [79] durch die Verwendung eines breitbandigen Femtosekundenlasers erreicht. Die Verbindung von relativ hoher axialer Auflösung ($3\ \mu\text{m}$) mit hoher lateraler Auflösung ($2\ \mu\text{m}$) wurde vier Jahre später von Aguirre et. al. [80] vorgestellt, womit die Grundlagen der heutigen hochaufgelösten OCT gelegt wurden. Mit einer Fokustiefe von $30\ \mu\text{m}$ bei einer axialen Auflösung von $3\ \mu\text{m}$ konnte mit mikroskopischer Auflösung mehr als eine einzelne Tiefenebene bei einer Volumenaufnahme aufgezeichnet werden. Das erste auf der FD-OCT basierende OCM, welche der TD-OCT in der Sensitivität und der Geschwindigkeit überlegen ist [81], wurde im Jahr 2005 von Choma et. al. [82] unter dem Namen „spectral domain phase microscopy“ präsentiert. Hierbei wurde ein Swept-Source-OCT System bei einer Zentralwellenlänge von $1300\ \text{nm}$ verwendet. Eine Kombination aus hoher lateraler und hoher axialer Auflösung basierend auf der FD-OCT wurde ein Jahr später von Leitgeb et. al. [69] präsentiert. Zur Erreichung der hohen axialen Auflösung wurde ein Femtosekundenlaser mit einer Zentralwellenlänge von $800\ \text{nm}$ und einer effektiven Bandbreite von $134\ \text{nm}$ verwendet, was in einer axialen Auflösung von $3,0\ \mu\text{m}$ resultierte. Die Bildgebungsgeschwindigkeit betrug nur $5000\ \text{A-Scans pro Sekunde}$. Lateral wurde eine Auflösung von $1,5\ \mu\text{m}$ erreicht. Sinnvolle *in vivo* Messungen in Tiermodellen waren aufgrund der geringen Geschwindigkeiten nur schwer möglich. Im Jahr 2011 wurde durch Liu et. al. [70] μOCT präsentiert. Dabei wurde eine Superkontinuum-Lichtquelle (SCQ) mit einer effektiven spektralen Bandbreite von $285\ \text{nm}$ bei einer Zentralwellenlänge von $800\ \text{nm}$, verwendet, was zu einer theoretischen axialen Auflösung von $1\ \mu\text{m}$ führte. Die NA des präsentierten Aufbaus beträgt $0,12$, womit eine laterale Auflösung von $2,4\ \mu\text{m}$ erzielt wurde. Um die Limitierung des Tiefenmessbereiches aufgrund der hohen lateralen Auflösung entgegenzuwirken, wurde in den Beleuchtungsstrahlengang eine Ringapertur einge-

bracht, was zu einem Besselstrahl ähnlichem Beugungsmuster und einer Verlängerung der Fokustiefe führte.

2.2.2.2 Grundlagen der Spektraldomain-OCT

Zum Verständnis der Bildentstehung in der OCT bietet es sich an, die axiale und laterale Bildentstehung getrennt voneinander zu betrachten. Wie bereits erläutert, handelt es sich bei der OCT um ein interferometrisches Bildgebungsverfahren. Ausgangspunkt für die Betrachtung soll eine Welle U_{in} mit dem Spektrum $s(k, \omega)$ sein, das sich in z-Richtung ausbreitet

$$U_{in} = s(k, \omega) e^{i(kz - \omega t)}. \quad (2.32)$$

Die Welle wird durch einen Strahlteiler in zwei Wellen aufgeteilt, welche als Referenz- und Probenwellen bezeichnet werden. Im Referenzarm durchläuft die Welle eine Strecke z_0 , bevor sie durch einen Spiegel mit der Amplitudenreflektivität η_r in seinen Ursprung zurück reflektiert wird. Die reflektierte Referenzwelle kann mathematisch durch

$$U_{Ref.} = \frac{U_{in}}{\sqrt{2}} \eta_r e^{i2kz_0} \quad (2.33)$$

beschrieben werden. Die zweite Welle dient zur Beleuchtung bzw. Abtastung des zu untersuchenden Objektes und wird als Probenwelle bezeichnet. Das aus der Probe zurückkehrende Licht kann als die Überlagerung von Wellen, die in verschiedenen Tiefen z mit der Effizienz $\eta(z')$ gestreut werden, dargestellt werden [46]. Für die Amplitude der aus der Probe zurückgestreuten Sekundärwelle gilt

$$U_{Probe} = \frac{U_{in}}{\sqrt{2}} \int_0^{\infty} \eta(z') e^{i2k(z_0 + n(z)z)} dz'. \quad (2.34)$$

Die beiden zurückgestreuten Sekundärwellen werden durch den Strahlteiler wieder zusammengeführt und auf einem Detektor mit der Empfindlichkeit ρ zur Interferenz gebracht. Der Detektorstrom ist dann durch

$$I_D(k, \omega) = \frac{\rho}{2} \left\langle \left| \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} \eta_r e^{i(2kz_0 - \omega t)} + \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} \int_0^{\infty} \eta(z') e^{i(2k(z_0 + n(z)z) - \omega t)} dz' \right|^2 \right\rangle \quad (2.35)$$

gegeben [46]. Des Weiteren ist für die Berechnung des Interferenzsignals nur die Weglängendifferenz zwischen der Referenz und der Probe von Interesse, weswegen z_0 gleich null gesetzt werden kann. Damit vereinfacht sich Gleichung 2.35. Das

Ausmultiplizieren führt zu den folgenden, zeitlich invarianten Termen

$$\begin{aligned}
 I_D(k) &= \frac{\rho}{4} \left[S(k) \left(\eta + \int_0^\infty \eta(z') dz' \right) \right] \\
 &+ \frac{\rho}{2} S(k) \int_0^\infty \eta(z') \cos(2kn(z)z) dz' \quad . \quad (2.36) \\
 &+ \frac{\rho}{4} S(k) \int_0^\infty \int_0^\infty \eta(z) \eta(z') e^{-i2kn(z)(z-z')} dz dz'
 \end{aligned}$$

- Der erste Term ist ein phasenunabhängiger Untergrund, der unabhängig von der Phasendifferenz zwischen Proben- und Referenzlicht ist.
- Der zweite Term enthält die Tiefeninformation des Objektes. Die Amplitude der Kosinusfunktion ist proportional zu der Streuamplitude $\eta(z)$.
- Der dritten Term (Autokorrelationsterm) beschreibt die Interferenzen zwischen der Streuung in verschiedenen Tiefen.

Das Interferenzsignal erzeugt auf dem Detektor einen Photonenstrom I_D . Nach einer Hochpassfilterung, um den phasenunabhängigen Untergrund zu eliminieren, lässt sich mittels Fouriertransformation der relative Weglängenunterschied zwischen dem Referenzspiegel und den einzelnen Streuzentren berechnen, was als A-Scan bezeichnet wird [46].

2.2.2.3 Axiale Auflösung

In der OCT wird die axiale Auflösung Δz im Allgemeinen als die volle Halbwertsbreite (FWHM) der axialen Punktspreizfunktion (PSF) definiert, welche sich als Signal einer einzelnen reflektierenden dielektrischen Oberfläche aus der Fouriertransformation des detektierenden Interferogramms berechnen lässt. Nach dem Wiener-Chintschim-Theorem ergibt sich die axiale PSF als die Fouriertransformation der spektralen Leistungsdichte (vergl. 2.17). Für eine gaußförmige Leistungsdichtenverteilung ergibt sich die axiale Auflösung durch

$$\Delta z_c = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (2.37)$$

mit der Zentralwellenlänge λ_0 und der FWHM $\Delta \lambda$ der gaußförmigen Leistungsdichtenverteilung. Hierbei wurde berücksichtigt, dass aufgrund des Hin- und Rückwegs des Lichtes zur und von der Probe die axiale Auflösung der halben Kohärenzlänge entspricht [46].

2.2.2.4 Gruppenlaufzeitdispersion

In der bisherigen Betrachtung des OCT Signals wurde die Dispersion vernachlässigt. Als Dispersion wird die Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex eines Materials bezeichnet. Sie führt dazu, dass sich die Phase bei unterschiedlichen Wellenlängen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ausbreiten. Dispersion wird in allen Medien außer im Vakuum beobachtet. Unterscheiden sich die optischen Medien

in Referenz- und Probenarm durch Verwendung verschiedener Optiken aber auch durch das zu untersuchende Objekt selbst, entsteht ein Ungleichgewicht zwischen der Dispersion in beiden Armen. Dies führt in der spektralen Interferenz zu einer nichtlinear von der Wellenzahl abhängigen Phasenverschiebung im Interferenzmuster, welche die Signalamplitude und die laterale Auflösung verringert. Diese negativen Effekte der Dispersion können durch optischen Ausgleich des Ungleichgewichtes in den beiden Interferometerarmen verhindert werden. Eine optische Anpassung der Dispersionsunterschiede ist nur über einen nicht zu großen Spektralbereich sinnvoll, wenn der Dispersionsunterschied mit Taylor-Approximation niederen Ordnung beschrieben werden kann. Bei großen Bandbreiten hat sich eine zusätzliche numerische Dispersionskorrektur bewährt [83].

Zur mathematischen Beschreibung des Einflusses der Dispersion auf das OCT-Signal kann in der Formel 2.36 die Phase mit der Propagationskonstante $k(\omega)$ auch als

$$\phi = 2k(\omega)n(z)z \quad (2.38)$$

geschrieben werden [51].

Ist die Dispersion in beiden Armen nicht identisch, besitzt die Propagationskonstante einen nicht-linearen Verlauf mit der Kreisfrequenz ω der optischen Strahlung. Angenähert werden kann $k(\omega)$ durch eine Entwicklung in einer Taylor-Reihe um die Zentralfrequenz ω_0 . Damit folgt für die Propagationskonstante

$$k(\omega) = \sum_{n=0}^N \frac{1}{n!} \frac{d^n k}{d\omega^n} (\omega - \omega_0)^n. \quad (2.39)$$

Im dispersionsfreien Fall ist $k(\omega) = k_0$ und somit die Phase eine lineare Funktion der Wellenzahl. Im Falle einer Gruppenverzögerung, bei der nur die erste Ableitung $\frac{dk}{d\omega}$ ungleich Null ist, ändern sich Signalstärke und axiale Auflösung ebenfalls nicht. Es kommt nur zu einer linearen Verschiebung des A-Scans. Die Dispersion zweiter Ordnung ist äquivalent zu einer nicht verschwindenden zweiten Ableitung $\frac{d^2k}{d\omega^2}$ und führt zur GVD, welche axialen Auflösung und die Signalstärke reduzieren. Gleiches gilt für alle höheren Terme. Die Reduzierung der axialen Auflösung, welche zu einer Verbreiterung der FWHM führt, ist aufgrund der Energieerhaltung mit einer Reduzierung des Signal-zu-Rausch Abstandes verbunden [51].

2.2.2.5 Laterale Auflösung und konfokale Filterung

Scannende OCT-Systeme verwenden Singlemode-Fasern oder Blenden, welche als Pinhole wirken. Deshalb kann die laterale Auflösung nach der Theorie der konfokalen Reflexionsmikroskopie beschrieben werden.

Im Folgenden soll zunächst die Bildentstehung untersucht werden, welche aufgrund der Konfokalität nicht allein durch die Gleichung (2.30) für die „kohärente Abbildung“ beschrieben werden kann. Bei einem RCM wird nicht nur das Licht ausgehend von einer Punktquelle in die Probe fokussiert, sondern auf dem Rückweg zum

Detektor durch ein konfokales Pinhole abgebildet, was das gestreute Licht filtert. Dadurch werden außerhalb des Fokusvolumens mehrfachgestreute Photonen effektiv unterdrückt. Zur Berechnung der lateralen Intensitäts-PSF kann zuerst das Feld $u(x,y)$ berechnet werden, welches von der Reflexion eines Strahles, der auf einen Objektpunkt fokussiert wird, resultiert. Es ist gegeben durch die Multiplikation der Amplituden-PSF der Beleuchtung \tilde{p}_{il} mit der Probenreflektivität r . Somit folgt für das Feld

$$u(x,y) = \tilde{p}_{il}(x,y) \cdot r(x,y). \quad (2.40)$$

Soll nun die Bestrahlungsstärke auf dem Detektor berechnet werden, so ist dies gegeben durch die Faltung von $u(x,y)$ mit der Amplituden-PSF der Detektion $\tilde{p}_{det}(-x, -y)$. Für die Bestrahlungsstärke gilt dann

$$E_{e,rCLSM} = \left| \iint u(x,y) \cdot \tilde{p}_{det}(x' + x, y' + y) dx' dy' \right|^2. \quad (2.41)$$

In der OCT erfolgt die Beleuchtung und Detektion im Allgemeinen durch die gleichen optischen Elemente. In diesem Fall vereinfacht sich Gleichung 2.41 zu

$$E_{e,rCLSM} = \left| \iint \tilde{p}(x,y)^2 \cdot r(x' - x, y' - y) dx' dy' \right|^2. \quad (2.42)$$

Im Vergleich von Gleichung 2.30 und Gleichung 2.42 ist ersichtlich, dass die konfokale Bildgebung zu einer verbesserten Auflösung führt. Des Weiteren bewirkt das Pinhole eine Unterdrückung von mehrfach gestreuten Photonen. Betrachtet man die Bestrahlungsstärke im Brennpunkt eines idealen konfokalen Mikroskops, so kann diese durch

$$E_e(a) = \left(\frac{2J_1(a)}{a} \right)^2 \quad \text{Mit } a = 2\pi x \cdot n \cdot \sin(\alpha) / \lambda_0 \quad (2.43)$$

beschrieben werden. x ist der laterale Abstand von der optischen Achse, α der Öffnungswinkel des Objektivs, λ_0 die Zentralwellenlänge der Lichtquelle und J_1 die Besselfunktion erster Ordnung. Der Ausdruck $n \cdot \sin(\alpha)$ ist die numerische Apertur (NA) [77].

Das Quadrat der Bestrahlungsstärke im Fokus $E_e(a)^2$ kann als laterale Punktspreizfunktion (PSF) angesehen werden. Deren FWHM, welche als Maß für die laterale Auflösung dienen soll, ist dann

$$\delta x = 0,37 \frac{\lambda_0}{\sin(\alpha)} = 0,37 \frac{\lambda_0}{NA}. \quad (2.44)$$

Das konfokale Gating, auch als Fokustiefe oder konfokale Amplitudenantwort bezeichnet, ist durch die Empfindlichkeit, mit der ein Objekt außerhalb der Fokusebene detektiert wird, charakterisiert [77].

Für ein ideales konfokales Mikroskop, dessen Eingangsapertur mit einem kollimierten

Strahl voll ausgeleuchtet wird, ist die Amplitudenantwort eines Punktstreuers im aberrationsfreien paraxialen Fall durch

$$E_e(z)_{Punkt} = \left(\frac{\sin\left(\frac{knz}{2}(1 - \cos\alpha)\right)}{\frac{knz}{2}(1 - \cos\alpha)} \right)^4 \quad (2.45)$$

gegeben. n ist der Brechungsindex des umgebenden Materials und α der Öffnungswinkel des Objektivs. Die Fokustiefe bzw. die Tiefe des konfokalen Gatings ist durch die Breite (FWHM) des Hauptmaximums

$$d_z = \frac{0,627\lambda_0}{n(1 - \cos\alpha)} \quad (2.46)$$

gegeben [77].

2.2.2.6 Dynamikbereich und Sensitivität

Zwei weitere wichtige Parameter zur Charakterisierung eines OCT-Aufbaus stellen neben der räumlichen Auflösung die Sensitivität und der Dynamikbereich dar. Das Verhältnis von Signalthöhe zu mittlerer Rauschhöhe wird als Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) bezeichnet. Für die FD-OCT ist es gegeben durch

$$SNR = \frac{i_D^2}{\sigma^2} \cdot N \quad (2.47)$$

mit der Signalamplitude i_D und der mittleren Rauschamplitude σ^2 , welche sich beide nach Gleichung 2.12 als Quadrat der Modulation des Interferenzsignals ergeben, und der Anzahl der Spektrometerkanäle N [81]. In der für die OCT üblichen logarithmischen Darstellung ergibt sich für das SNR

$$SNR = 20 \left(\log_{10} \left(i_D \cdot \sqrt{N} \right) - \log_{10}(\sigma) \right). \quad (2.48)$$

Das Gesamtrauschen des Systems ergibt sich nach $\sigma^2 = (\sigma_{RIN}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{photon}^2)$, aus dem relativen Intensitätsrauschen σ_{RIN}^2 , dem Detektorrauschen σ_{det}^2 und dem Photonenrauschen σ_{photon}^2 . Das relative spektrale Intensitätsrauschen (RIN) beschreibt die relativen Änderungen der Spektralkomponenten zwischen dem aktuellen Spektrum und dem Referenzspektrum, welches zur Normierung verwendet wird. Es steigt proportional zur Proben- und Referenzleistung auf dem Detektor. Das Detektorrauschen fasst alle den Detektor betreffende Rauschquellen wie das Rauschen der Verstärkerschaltung, Quantisierungsrauschen und das Dunkelrauschen, die nicht von der Signalthöhe abhängen, zusammen [81].

In den heutigen OCT-Systemen wird das Rauschen im OCT-Signal von Photonenrauschen dominiert, welches durch die Wurzel der detektierten Photonen $n_r + n_p$ aus Proben- und Referenzlicht gegeben ist.

Mit dem Signal $i_D^2 = n_r \cdot n_p$ ergibt sich für das SNR

$$SNR = 20 \left(\log_{10} \sqrt{n_r \cdot n_p \cdot N} - \log_{10} \sqrt{\sigma_{RIN}^2 + \sigma_{det}^2 + (n_r + n_p)} \right). \quad (2.49)$$

Das maximal zu erreichende SNR wird in der Regel durch die Sättigungsladung n_{FWC} (Full-Well-Kapazität) des Spektrometers begrenzt und wird dann erreicht, wenn das Spektrum mit einer Maximalamplitude von n_{FWC} voll durchmoduliert ist.

$$n_{FWC} = n_r + n_p + 2\sqrt{n_r \cdot n_p} \quad \text{mit } n_r = n_p. \quad (2.50)$$

Dies wird erreicht, wenn aus Probe in jedem Kanal $n_p = n_{FWC}/4$ Photonen detektiert werden. Aus diesen Überlegungen folgt für das Maximale, durch die Full-Well-Kapazität begrenzte SNR

$$SNR_{FWC} = 20 \left(\log_{10} \left(\frac{n_{FWC}}{4} \cdot \sqrt{N} \right) - \log_{10} \sqrt{\sigma_{RIN}^2 + \sigma_{det}^2 + \frac{n_{FWC}}{2}} \right). \quad (2.51)$$

Das kleinste in diesem Fall mit $SNR = 0$ dB messbare Signal wird durch den zweiten Summanden bestimmt. Damit ist SNR_{FWC} gleichzeitig auch der Dynamikbereich, mit dem ein schwaches Signale in Gegenwart eines das OCT voll aussteuernden starken Signal gemessen werden kann.

Die Sensitivität eines OCT-Systems ist definiert als die minimale Reflexion in einer Probe, die mit einem SNR von 1 gemessen werden kann [81, 84]. Mit bekannter Quanteneffizienz η und Bestrahlungsstärke auf der Probe P_{Probe} kann die maximal erreichbare Sensitivität wie folgt abgeschätzt werden [85]

$$Sens_{max} = 10 \cdot \log_{10} \frac{\eta P_{Probe} \tau_i}{4E_v}. \quad (2.52)$$

τ_i ist die Integrationszeit des Spektrometers und $E_v = hc/\lambda$ die Photonenenergie. Es wird dabei angenommen, dass das Schrotrauschen der Photonen die einzige Rauschquelle ist. Setzt man die Proportionalität zwischen dem SNR und der Probenreflektivität R voraus, kann aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis SNR_R , mit dem eine Struktur der Reflektivität R gemessen werden kann, die Sensitivität wie folgt berechnet werden [84]

$$Sens_{max} = \frac{R}{SNR_R}. \quad (2.53)$$

3 Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Mikroskopische OCT

Für die Messung von Mukustransport in lebenden Mäusen wurde ein Mikroskop entwickelt, welches die optische Kohärenztomographie zur Bildgebung verwendet und sich insbesondere durch seine hohe Messgeschwindigkeit von 127.000 A-Scans pro Sekunde und seine hohe räumliche Auflösung im Mikrometerbereich auszeichnet.

3.1.1 Optischer Aufbau

Zur Realisierung einer OCT mit mikroskopischer Auflösung (mOCT) wurde ein klassisches Michelson-Interferometer verwendet. Der Aufbau ist vereinfacht in Abbildung 3.1 dargestellt. Als Breitbandlichtquelle wird ein Superkontinuum-Laser

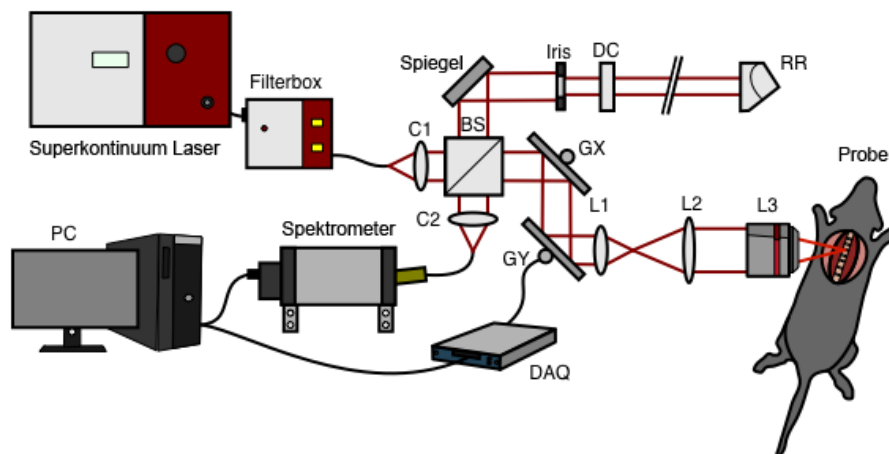


Abbildung 3.1: Schematische Aufbauskinne für das mikroskopische OCT: Kollimatoren: C1 bzw. C2; nichtpolarisierender 50:50 Strahlteiler: BS; XY Galvanometer Spiegel: GX und GY; Strahlauflweitungs-Linsen: L1 und L2; Mikroskop Objektiv: L3; Glassubstrat zur Dispersionskorrektur: DC; Digital Analog Wandler: DAQ; Retroreflektor: RR

(SuperKExtreme EXW-OCT, NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) (SQL) verwendet, welcher aus Pikosekunden-Laserpulsen (≈ 7 ps) [86] mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1064$ nm durch nichtlineare Effekte in einer photonischen Kristallfaser (PCF) ein Superkontinuum von 450 nm bis 2400 nm erzeugt (Abb. 3.2). Für die Bildgebung wird nur der Bereich zwischen 550 nm und 950 nm verwendet. Hierfür wird das aus einer Faser austretende Licht in einer speziellen Filtereinheit (SuperKSelect, NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) von einem Kurzpassfilter auf einen Wellenlängen-

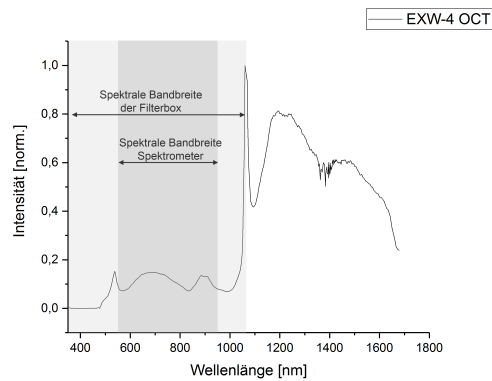


Abbildung 3.2: Spektrale Leistungsdichteverteilung der EXW-4-OCT Lichtquelle.

bereich von knapp unter 1000 nm begrenzt. Die ausgekoppelte Leistung beträgt ca. 75 mW. Durch zwei Justierspiegel, welche direkt mit der Filtereinheit verbunden sind, wird das Licht in eine Monomode-Faser mit großem Kern (FD-7, NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) gekoppelt. Von der Faser wird das Licht in den optischen Aufbau über einen Kollimator (60FC-L-4-M25-02, Schäfter + Kirchhoff GmbH, Hamburg, Deutschland) eingekoppelt. Dieser besitzt eine effektive Brennweite von 25 mm, woraus ein Strahldurchmesser von 5,8 mm resultiert. Der kollimierte Strahl wird durch einen nicht polarisierenden Strahlteiler (BS014, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) mit einem Teilungsverhältnis von 50:50 auf den Referenz- und den Probenarm aufgeteilt. Da die OCT ein punktweise abtastendes Verfahren ist, muss zur Bildgenerierung die zu untersuchende Probe durch den fokussierten Lichtstrahl abgerastert werden. Der Probenarmstrahl läuft über X-Y-Paar Galvanometer-Spiegel (6200H, Cambridge Technology, Bedford, USA) mit einer maximalen Auslenkung von $\pm 20^\circ$, in ein 1:2 Teleskopsystem, welches den Strahl auf etwa 12 mm aufweitet. Hierfür wurden zwei Achromaten (ACN254-050-B und AC254-100-B, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) in einer $4f$ -Konfiguration angeordnet. Das Teleskopsystem ist so ausgelegt, dass es den Pivotpunkt der schneller scannenden Achse in die rückseitige Aperturbene des Objektivs abbildet, welches dann den Lichtstrahl in die Probe fokussiert. Je nach gewünschter lateraler Auflösung wurden verschiedene Objektive benutzt, welche in Abschnitt 3.6.2 weiter spezifiziert sind. Nach dem Strahlteilung läuft der Strahl im Referenzarm durch eine Irisblende (SM1D12C, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) mit welcher er zwecks Intensitätsreduktion radial begrenzt werden kann. Der Strahl läuft dann durch ein 15 mm langes SF57 Glassubstrat (Casix Inc., Fujian, China), welches als Vorkompensation der GVD zwischen beiden Interferometer-Armen fungiert, und fällt dann auf einen Retroreflektor (PS975M-B, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland). Dieser reflektiert das Licht in identischer Richtung wieder zurück in den Strahlteiler. Das Licht aus dem Referenzarm überlagert sich im Strahlteiler mit dem aus der Probe zurückgestreuten Licht und wird über die bisher nicht genutzte Seite des Strahlteilers über einen weiteren Kollimator (60FC-L-4-M25-02, Schäfter + Kirchhoff GmbH, Hamburg, Deutschland) in eine

Monomode-Faser (SM640, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) eingekoppelt. Über diese wird das Licht auf das Spektrometer (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland), welches einen spektralen Bereich von 550 nm bis 950 nm abdeckt, eingekoppelt. Das Spektrometer erreicht eine Linienrate von 127.000 Hz bei Nutzung der vollen Anzahl von 2048 Pixel.

3.1.2 Mechanischer Aufbau

Bei der mechanischen Auslegung der mOCT wurde auf eine größtmögliche Unempfindlichkeit gegenüber der Dejustierung der Strahlengänge geachtet, da Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang kollinear verlaufen müssen. Der Strahlengang ist daher auf einem Sandwich-Experimentierbrett mit einem optomechanischen Stangensystem aufgebaut (Abb. 3.3). Die mechanische Verbindung aller Komponenten durch meist vier Stangen erhöht die Stabilität und verhindert eine Verdrehung einzelner optischer Komponenten. Um die Kollinearität zu ermöglichen, sind hinter dem Kollimator des Beleuchtungsstrahlenganges bzw. vor dem Kollimator des Detektionsstrahlenganges jeweils zwei Spiegel (#68-329, Edmund Optics GmbH, Mainz, Deutschland) montiert. Zur Gewährleistung der Lasersicherheit ist der Strahlengang durch ein Metallgehäuse abgeschirmt.

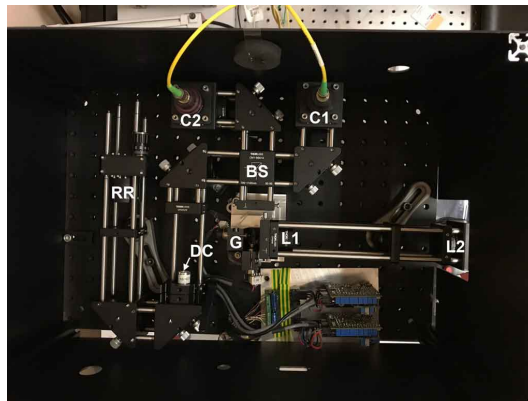


Abbildung 3.3: Optomechanischer Aufbau des mOCTs. Folgende Komponenten sind sichtbar. Beleuchtungs- bzw. Detektionskollimatoren: C1 bzw. C2; nichtpolarisierender Strahlteiler: BS; XY Galvanometer Spiegel: G; Strahlaufweitungs-Linsen: L1/L2; Glassubstrat zur Dispersionskorrektur: DC; Retroreflektor: RR

Als interferometrisches Messverfahren ist die mOCT empfindlich gegenüber axialen Bewegungen im Nanometerbereich. Insbesondere im Bereich der Zilienschlagfrequenz von 8 – 20 Hz soll der Aufbau eine hohe Dämpfung gegenüber Bodenschwingungen aufweisen. Um dies zu gewährleisten, ist das mOCT auf einem, mittels Druckluft aktiv gedämpften, optischen Tisch (ScienceDesk, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) aufgebaut. Bei den Dämpfungselementen handelt es sich um sogenannte Doppelkammersysteme, welche durch ihre geringe Federkonstante [87] zu einer Resonanzfrequenz von 1,5 Hz in axialer Richtung führen. Nach Herstellerangaben ist dadurch bei 8 Hz

eine Dämpfung von 32,5 dB erreicht, welche sich bis hin zu 20 Hz weiter auf 45 dB reduziert [88].

Neben der optischen Funktionalität spielt für eine effiziente Durchführung von Versuchen an Tieren die Bedienbarkeit eine große Rolle, welche daher bei der Konstruktion der mechanischen Teile des Mikroskops besonders berücksichtigt wurde. Hierzu wurde das Breadboard mit dem Strahlengang auf einem massiven Fuß platziert, um einen speziellen Mikroskopierteisch für Kleintiere (Intravitalstage, Lavision Biotech, Bielefeld, Deutschland) in den Aufbau implementieren zu können. Der Mikroskopierteisch lässt sich motorisiert horizontal in x- und y-Richtung um 50 mm mit einer Schrittweite von weniger als 1 μm verfahren. Der Tisch weist im Vergleich zu anderen Tischen einen sehr hohen vertikalen Verfahrweg von 80 mm auf, was über einen präzisen hydraulischen Antrieb ermöglicht wird. Zusammen mit der 537 mm x 450 mm großen Fläche bietet er sehr gute Voraussetzungen für eine präzise Positionierung von Tieren und statischen Proben. Der gesamte Aufbau ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

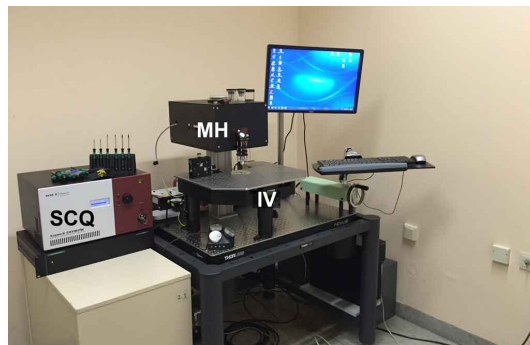


Abbildung 3.4: mOCT-Aufbau für die Kleintierbildgebung mit der Superkontinuum-Quellen (SCQ), der Intravitalstage (IS) und dem verkapselten Mikroskopaufbau (MH).

3.2 Endomikroskopische OCT

3.2.1 Optischer Aufbau

Der Aufbau für die endomikroskopische OCT basiert auf dem in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen mOCT-Aufbau. Statt des offenen Michelson Interferometers wird ein faserbasiertes Interferometer verwendet. Schematisch ist der Aufbau in Abbildung 3.5 dargestellt.

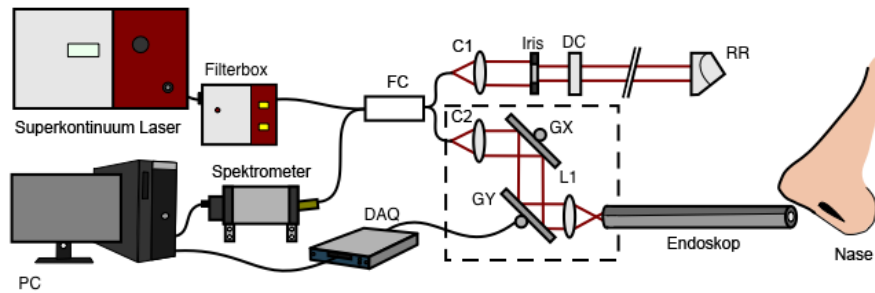


Abbildung 3.5: Schematische Aufbauskitze für die emOCT: faseroptische 50:50 Strahlteiler: FC; Kollimatoren: C1/C2; Glassubstrat zur Dispersionskorrektur: DC; Retroreflektor: RR; XY Galvanometer Spiegel: GX und GY; Scanlinse: L1; Digital Analog Wandler: DAQ

Als Breitbandlichtquelle werden ebenfalls der Superkontinuum-Laser (SuperKExtreme EXW-OCT, NKT Photonics, Birkerød, Dänemark), die Filtereinheit (SuperKSelect, NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) und die Monomode-Faser mit erhöhtem Kerndurchmesser (FD-7, NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) verwendet. Im Gegensatz zur mOCT wird kein offenes, sondern ein Faserinterferometer verwendet. Über die Monomode-Faser wird das Licht zu dem faserbasierten Strahlteiler geführt (TW670R5A2, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland), in welchem das Licht in einem Verhältnis von 50 : 50 in die Referenz- und Probenfaser (beide SM640, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) aufgeteilt wird. Das Licht aus der Probenarmfaser wird durch einen Kollimator (60FC-4-M12-02, Schäfter + Kirchhoff GmbH, Hamburg, Deutschland) in einen mit dem Endoskop modifizierten Thorlabs "Standard OCT-Scanner" (OCTG-830, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) eingekoppelt. Die Referenzfaser führt über einen Kollimator (60FC-4-A18-02, Schäfter + Kirchhoff GmbH, Hamburg, Deutschland) zu einem offenen Referenzarm. Hier durchläuft der Strahl eine Irisblende (SM1D12C, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland), mit welcher der Strahl zwecks Intensitätsreduktion radial begrenzt werden kann. Zur Vorkompensation der GVD zwischen dem Referenz- und dem Probenarm durchläuft der Strahl ein 30 mm langes SF57 Glassubstrat (Casix Inc., Fujian, China), bevor er auf einen Retroreflektor (PS975M-B, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) trifft. Dieser reflektiert das Licht wieder zurück in die Faser des Strahlteilers. In dem faserbasierten Strahlteiler überlagert sich das aus der Probe zurückgestreute und von dem Retroreflektor reflektierte Licht und wird über den verbleibenden Ausgang in ein zu dem in Abschnitt 3.1.1 beschriebenes, baugleiches Spektrometer eingekoppelt.

3.2.2 Endoskop für die mOCT

Das Design des GRIN Endoskops ist schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt. Das GRIN Endoskop wurde kundenspezifisch von der Firma Grintech gefertigt. Die Auslegung der Optik erfolgte mit der Optikdesign-Software OpticsStudio 14 (Version 14, Zema LLC, Kirkland, USA) für monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 750 nm. Als Grundlage für die Auslegung dienten vom Hersteller bereitgestellte

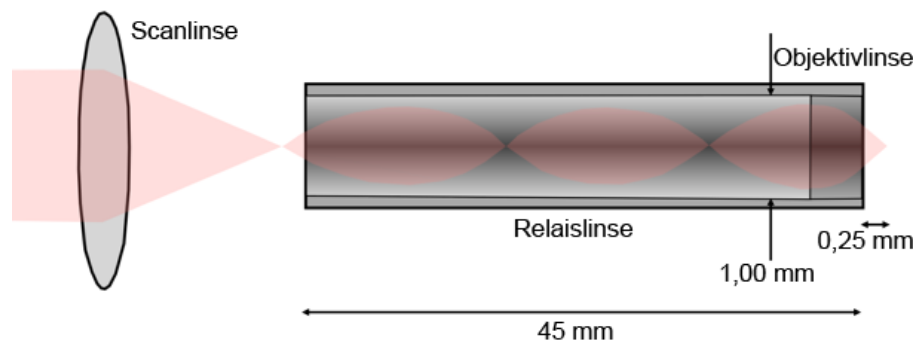


Abbildung 3.6: Optischer Aufbau des Endoskops mit der Scan-Linse, der Relais- und Kollimationslinse mit geringer NA und der Objektivlinse mit hoher NA, beide als GRIN-Linse ausgeführt.

Brechzahlprofile [89] der GRIN-Linsen. Das Endoskop besteht aus einer 39,7 mm langen GRIN Linse mit einer NA von 0,19, welche zur Übertragung des Bildes dient (Relay-Optik) und einer GRIN Linse mit einer höheren NA von 0,5, welche eine vergrößerte Abbildung ermöglicht. Dieses spezielle Design führt zu einer maximal nutzbaren NA von 0,5 bei einer Vergrößerung von 2,6. Bei einem Durchmesser von 1,0 mm beträgt die gesamte Länge 4,5 cm. Beide Linsen wurden vom Hersteller durch Klebung miteinander verbunden. Zur mechanischen Stabilisierung wurde die Optik in ein Edelstahlröhrchen (Harry Rieck Edelstahl GmbH, Hilden, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 2,75 mm geklebt. Über einen eigens entwickelten Adapter, der auf Komponenten der Fa. Thorlabs GmbH (Dachau, Deutschland) basiert, ist das Endoskop mit einem modifizierten OCT-Scanner (OCTG, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) verbunden (Abb. 3.7). Das aus der Probenarmfaser

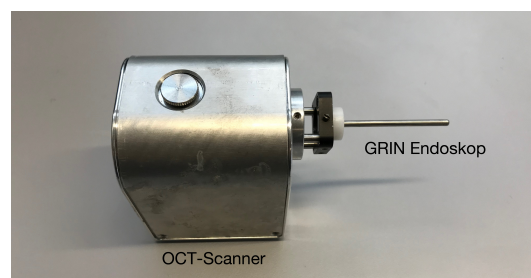


Abbildung 3.7: Foto des emOCT-Endoskop.

emittierte Licht wird über eine Faser in das Handstück gekoppelt, wo es nach Kollimation durch zwei Galvanometerspiegel (6200H, Cambridge Technology, Bedford, USA) in beide Raumrichtungen abgelenkt wird. Das kollimierte Licht wird durch einen Achromaten (49-948, Edmund Optics, Barrington, USA) in die rückseitige Brennebene des GRIN Endoskops, welche sich ca. 100 μm vor der Endfläche befindet, fokussiert. Aufgrund des gewählten Strahldurchmessers wird nur knapp die Hälfte der zur Verfügung stehenden NA (ca. 0,23) verwendet. Aus der Simulation der Bildgebung mit OpticsStudio ergibt sich unter Annahme einer Ausleuchtung der Apertur durch einen Gauß-Strahl mit 2,3 mm Durchmesser eine beugungsbegrenzte

Punktspreizfunktion (Airy-Funktion) mit einem Abstand der Nullstellen von $1,80 \mu\text{m}$ und mit einer entsprechenden Halbwertsbreite (FWHM) von $1,1 \mu\text{m}$. Der Durchmesser des GRIN Endoskops limitiert das maximale Bildfeld bei der gewählten Vergrößerung auf ca. $200 \mu\text{m}$.

3.3 Ansteuerung und Datenaufnahme

Die Datenerfassung erfolgt durch die speziell für ihre OCT-Geräte entwickelte Software ThorImage (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland). Durch Wahl identischer elektronischer Komponenten konnten das mOCT und das emOCT von der gleichen Software angesteuert werden.

3.3.1 Ansteuerung

Die elektrischen Steuerverbindungen der wichtigsten Komponenten sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Zeilenkamera (Sprint SpL4096 140km, Basler, Reinfeld,

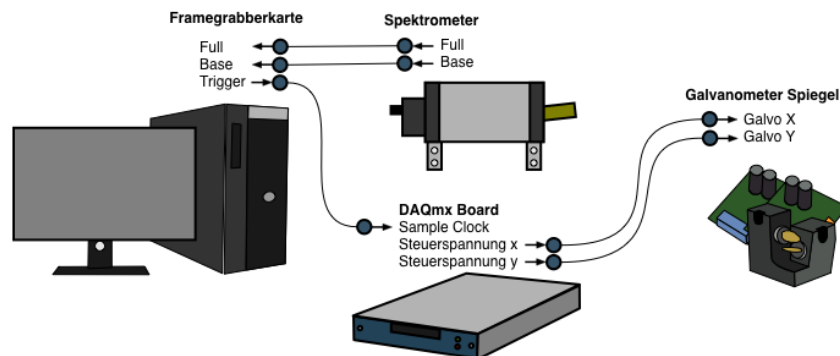


Abbildung 3.8: Verschaltungsplan des mOCT-Aufbaus

Deutschland) des Spektrometers ist über eine Framegrabber-Karte (1433, National Instruments, Austin, USA) an eine Dell Workstation (T1700, Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland), mit Intel Xeon E-1217v3 Prozessor und 64-Bit Windows 7 Betriebssystem, angebunden. Das von der Software generierte Steuersignal wird über eine Digital-Analog-Wandler Box (USB-6251, National Instruments, Austin, USA), welche über USB mit der Workstation verbunden ist, an den die Steuerspannung generierenden Galvanometer-Treiber übertragen. Bewegungen der Galvanometer-Spiegel während der Belichtungszeit eines A-Scans können zu einer Reduzierung der Signalamplituden durch Verwischen der Interferenzmuster (Fringe-Washout) führen [90]. Eine stufenweise Ansteuerung der Galvanometer-Spiegel ist daher nötig. Um dies gewährleisten zu können, wurde der Linientrigger (Linienrate = A-Scanrate) der Zeilenkamera als Taktfrequenz für die Digital-Analog-Wandler Box genutzt.

3.3.2 Datenakquisition

Für die Datenaufzeichnung bei den *in vitro* und Organkultur-Messungen wurde wenn möglich die ThorImage Software benutzt. Nur für die Tierstudie zur Wirkung verschiedener inhalierter Lösungen kam ein in Labview (Version 2013, National Instruments, Austin, USA) geschriebenes Programm zum Einsatz.

3.3.2.1 ThorImage

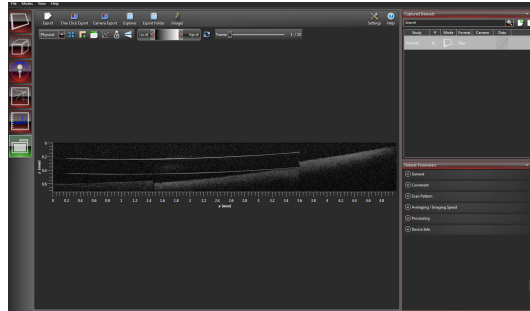


Abbildung 3.9: Bedienoberfläche der Software ThorImage (Thorlabs), welche zur Steuerung und Bildaufnahme von mOCT und emOCT eingesetzt wurde.

Die Bedienoberfläche der ThorImage Software ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Software bietet die Möglichkeit, sowohl die Aufnahme von A-Scan, B-Scans oder Volumen live darzustellen und aufzuzeichnen. Dabei werden die Datensätze im Thorlabs eigenem Datenformat direkt auf die Festplatte gespeichert. Diese Dateien beinhalten die von der Zeilenkamera aufgezeichneten Spektren sowie alle für die Prozessierung nötigen Datensätze und Metainformationen. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, die Daten mit eigener Software zu prozessieren (Abschnitt 3.3.2.2) und dabei die GVD für verschiedene Bildbereiche (Abschnitt 3.5) numerisch zu kompensieren.

3.3.2.2 Eigene Software für die Tierstudie

Das Studium des Mukustransportes im Tier erforderte mehrstündige Messungen in dem gleichen Areal. Die ThorImage Software bietet hier nur die Möglichkeit einer kontinuierlichen Aufzeichnung, wobei die Aufnahmezeit durch die Größe des Arbeitsspeichers begrenzt ist. Eine Aufnahme mit der vollen Geschwindigkeit von 127 kHz erzeugt eine Datenmenge von 3,75 TB pro Stunde, welche nicht sinnvoll zu verarbeiten wäre. Um dieses Problem zu lösen, wurde auf der Grundlage des von Thorlabs mitgelieferten SDKs ein Programm in der Sprache Labview (Vers. 2014-2017, National Instruments, USA) entwickelt, welches es ermöglicht, in einem festen zeitlichen Abstand einzelne oder Gruppen von B-Scans aufzuzeichnen und direkt auf der Festplatte abzuspeichern. Die dabei erzeugte Datenmenge liegt nur in einem Bereich zwischen 5 und 10 GB pro Stunde. Die Benutzeroberfläche ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

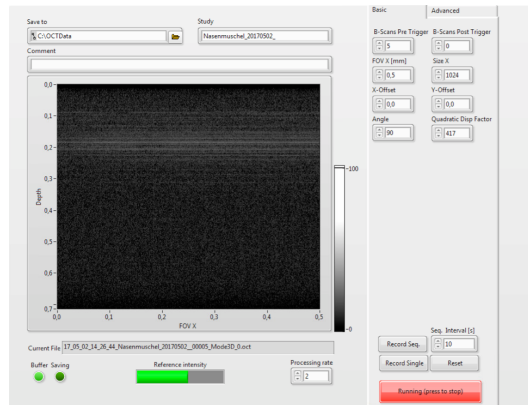


Abbildung 3.10: Bedienoberfläche des in Labview entwickelten Programms zur Aufzeichnung von Zeitserien innerhalb der Tierstudie.

3.4 Datenauswertung

3.4.1 Datenprozessierung

In den Tierexperimenten wurden die aufgezeichneten Bildsequenzen ohne vorherige Prozessierung als vom Spektrometer gemessene Rohdaten auf die Festplatte des Messrechners gespeichert. Die Prozessierung der Daten erfolgte off-line. Die Daten wurden in einem Datenformat gespeichert, welches eine automatisierte oder manuelle Auswertung ermöglicht. Aufgrund der großen Datenmenge erfolgte die Prozessierung automatisch mit einer in Matlab (Matlab2015a, Mathworks, Natick, MA, USA) realisierten Software, welche eine Stapelverarbeitung einer großen Menge von Datensätzen ermöglichte. Abbildung 3.11 zeigt die Benutzeroberfläche der erstellten Software.

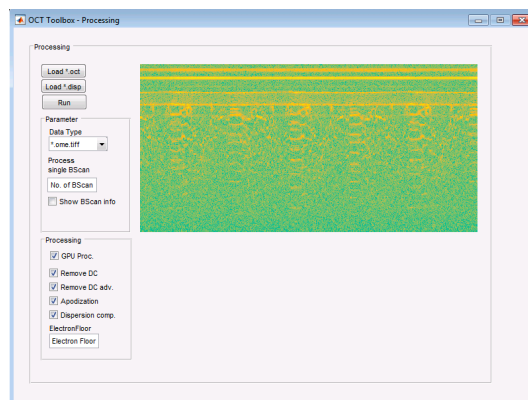


Abbildung 3.11: Bedienoberfläche des in Matlab entwickelten Programms zur Prozessierung der Daten.

Dispersionsbedingte Bildfehler wurden automatisch, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, kompensiert, um die höchstmögliche Auflösung zu erreichen. Die Prozessierung wurde auf einer Workstation mit einem Intel Core i7-4790 Prozessor durchgeführt. Zur Beschleunigung wurde die Berechnung der B-Scans mittels CUDA auf einer GTX 980ti Grafikkarte parallelisiert durchgeführt. Die prozessierten Daten wurden je nach

späterer Verwendung in folgende Formate abgespeichert:

- *.ome.tiff; Intensitätsbild; Bioformat mit Metadaten
- *.raw; Intensitätsbild; Binary Single Precision
- *.cmplx; Bild der komplexen Amplituden; Binary Single Precision
- *.mat; Bild der komplexen Amplituden Daten; Matlab Datentyp
- *.fits; Intensitätsbild

3.4.1.1 Algorithmus

Der A-Scan wurde durch eine komplexe Fouriertransformation aus dem korrigierten Spektrums $I(k)$ berechnet. Die Amplitude der Transformation ist proportional zur Reflektivität und die Phase wird durch die Weglängendifferenzen zwischen dem Referenzarm und den Streuern in der Probe bestimmt. Vor der Fouriertransformation wurden die gemessenen Spektren verschiedenen numerischen Korrekturverfahren unterzogen, um eine optimale Bildqualität zu erreichen.

Die eigene Prozessierung der OCT-Daten folgte im Wesentlichen der Prozessierung in ThorImage [91].

Schritt 1: Entfernung des Dunkelsignals Von dem gemessenen Interferogramm $I_g(n_\lambda)$ wird das Dunkelsignal $I_d(n_\lambda)$ der Kamera abgezogen. n_λ ist die Position des Kamerapixels. Die Aufzeichnung des Dunkelsignals-Korrekturvektors $\bar{I}_d(n_\lambda)$ erfolgt ohne Belichtung der Kamera. Zur Verringerung des Rauschens wird über mehrere hundert aufgezeichnete Spektren gemittelt. Für das neue korrigierte Signal I_{σ_d} ergibt sich somit

$$I_{\sigma_d}(n_\lambda) = I_g(n_\lambda) - \bar{I}_d(n_\lambda). \quad (3.1)$$

Schritt 2: DC Bereinigung Der Gleichanteil des Signals besitzt für die Bildgebung keine Relevanz. Nach der Fouriertransformation erzeugt er bei der Weglängendifferenz Null ein starkes Artefakt, das unterdrückt werden kann, wenn das Spektrum ohne Interferenz, das sogenannte Referenzspektrum $I_{ref}(n_\lambda)$, vom gemessenen Spektrum subtrahiert wird. Zur Aufnahme des Referenzspektrums wird der Probenarm geblockt und nur das interferenzfreie Signal aufgezeichnet. Gewöhnlich wird auch hier über 10 – 25 Aufnahmen gemittelt. Das um den Gleichanteil (DC) bereinigte Signal ergibt sich dann zu

$$I_{DC}(n_\lambda) = I_{\sigma_d}(n_\lambda) - I_{ref}(n_\lambda). \quad (3.2)$$

Schritt 3: Apodisation Das aufgezeichnete Interferogramm ist nur auf einem endlichen Bereich definiert. Dies führt zu Artefakten, die in der Signalverarbeitung als Leck-Effekt oder Fenster-Effekt bezeichnet werden [92]. Mathematisch kann die endliche Ausdehnung des Interferogramms als eine Faltung mit einer Rechteckfunktion dargestellt werden. Die axiale Punktspreizfunktion ist die Fouriertransformierte dieses Rechteckes, welche relativ starke Seitenbänder besitzt. Vermindern lässt sich der Leck-Effekt, in dem das Signal mit einer Fensterfunktion $w(n_\lambda)$ multipliziert wird, die Kanten oder hohe Steigungen vermeidet. In der OCT ist die Fensterung mit einer Hann-Funktion üblich. Zusätzlich wird das Interferogramm durch den Apodisationsvektor geteilt, um Modulation im spektralen Verlauf zu kompensieren. Das apodisierte Singal ergibt sich dann durch

$$I_w(n_\lambda) = \frac{I_{DC}(n_\lambda)}{I_{ref}} \cdot w(n_\lambda). \quad (3.3)$$

Schritt 4: Reskalierung Der A-Scan entsteht durch Fouriertransformation nach $k = 2\pi/\lambda$ aus dem mit dem Spektrometer aufgezeichneten Interferogramm. In einem Gitterspektrometer, wie es in dieser Arbeit verwendet wird, erfolgt die Separation der verschiedenen Wellenlängen in erster Näherung linear mit der Wellenlänge λ . Dies führt in dem vom Detektor gemessenen Interferogramm zu einer wellenlängenabhängigen Frequenz des Interferenzsignals. Die Fouriertransformation liefert dann eine axiale Punktspreizfunktion, die tiefenabhängig verbreitert ist. Um das zu verhindern, wird vor der Fouriertransformation das korrigierte Spektrum in die Propagationskonstante $k(n_\lambda)$ umskaliert. In dieser Arbeit wurde eine lineare oder kubische Interpolation des Softwarepakets Matlab [93] für die Reskalierung verwendet

$$I_w(n_k) = \text{interp}(n_\lambda, I_w(n_\lambda), n_k) \quad (3.4)$$

mit n_k den für k äquidistanten Stützstellen.

Schritt 5: Dispersionskorrektur Die Effekte von Dispersionsunterschieden zwischen Proben- und Referenzstrahl auf das OCT-Signal werden durch die Multiplikation mit einem Phasenterm korrigiert (Details siehe 3.5). Für das Signal ergibt sich somit

$$I_{Disp}(n_k) = I_w(n_k) \cdot e^{-i\Psi(n_k)}. \quad (3.5)$$

Schritt 6: Fouriertransformation Anschließend wird der A-Scan mittels einer schnellen Fouriertransformation (FFT) berechnet. Dabei wird der Betrag für die Darstellung des Bildes verwendet. Die Phaseninformation kann für weitere, funktionelle Analysen wie z. B. Doppler Messungen genutzt werden.

In den OCT-Bildern wird der dekadische Logarithmus des Betragsquadrates der Fouriertransformation dargestellt. Ein A-Scan ergibt sich damit als

$$AScan(\tau) = 20 \cdot \log_{10} |\text{FFT}(I_{Disp}(n_k))|. \quad (3.6)$$

3.5 Numerische Dispersionskorrektur

Durch das Einbringen eines hochbrechenden SF-57 Materials in den Referenzarm wurde die Differenz der Gruppengeschwindigkeitsdispersion zwischen dem Proben- und Referenzarm vorkompensiert. Der noch verbleibende Anteil wurde im Anschluss mit numerischen Verfahren kompensiert.

3.5.1 Dispersionskorrektur

Da die spektrometerbasierten OCT-Systeme ein in axialer Richtung kohärentes Bildgebungsverfahren darstellen, stehen neben der Amplitude auch die Phaseninformationen zur Verfügung. Dies ermöglicht eine numerische Korrektur der Dispersion durch Multiplikation des Interferogramms mit dem konjugiert komplexen Phasenterm $Z_{korr}^* = e^{-i\Psi(k)}$, der die Spektren verzerrt [57].

Ziel der Dispersionskorrektur ist es, für den unbekannt durch Dispersion erzeugten Phasenfehler, die Konstanten β_m der Polynomapproximation

$$\Psi(k) = \beta_0 + \beta_1(k - k_0) + \beta_2(k - k_0)^2 + \beta_3(k - k_0)^3 + \dots + \beta_m(k - k_0)^m \quad (3.7)$$

zu bestimmen [94]. In dieser Arbeit wurde ein iterativer Optimierungsansatz zur Bestimmung von β_m gewählt, der die Bildschärfe in den B-Scans optimiert. In der OCT hat sich die Shannon-Entropie [95]

$$H = -\sum_{x,y} i_D^2(x,y) \cdot \log(i_D^2(x,y)). \quad (3.8)$$

als geeignete Metrik zur Beurteilung der Schärfe eines Bildes erwiesen [51, 94]. Für die Dispersionskorrektur wurden die Dispersionskoeffizienten $\{\beta_2, \dots, \beta_m\}$ variiert, bis die Shannon Entropie ein Minimum erreichte.

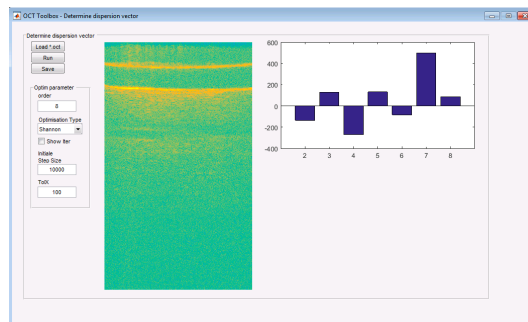


Abbildung 3.12: Bedienoberfläche des Matlab-Programms zur Bestimmung der Dispersionskoeffizienten β_2, \dots, β_m durch Optimierung der Bildschärfe.

Algorithmische Umsetzung Zur Minimierung von $H(\beta_2, \dots, \beta_m)$ wurde das Nelder-Mead-Verfahren eingesetzt, das die Punkte $p = \{\beta_2, \dots, \beta_m\}$ im Parameterraum in

jeder Iteration entsprechend dem Gradienten der Optimierungsfunktion ändert, sodass sich der Korrekturvektor dem Optimum annähert.

1. Ausgangspunkt für die Optimierung ist das zweidimensionale Interferogramm $I_0(k, x)$.
2. Multiplikation des Interferogramms mit dem durch die Optimierungsroutine angepassten Phasenterm $e^{-i\Psi(k, p)}$.
3. Berechnung des B-Scans durch Fouriertransformation
4. Berechnung der Shannon-Entropie $H(p)$
5. Überprüfen, ob das Abbruchkriterium erfüllt ist
 - Abbruchkriterium: $\|p_i - p_{i-1}\| < TOL$,
für die Iteration i und die Schritttoleranz TOL erfüllt ist
 - Wenn nicht erfüllt, starten bei Schritt 1

Umgesetzt wurde der Algorithmus in einem Matlab-Programm, dessen Benutzeroberfläche in Abbildung 3.12 dargestellt ist. Das Programm liest das Datenformat von ThorImage direkt ein. Der Nutzer kann auswählen, welche Ordnungen der Polynomfunktion Ψ maximal berücksichtigt werden sollen. Um Dispersion in der Probe zu berücksichtigen, kann durch Definition bestimmter Regionen (ROI), die Bildqualität für eine bestimmte Tiefe oder einen bestimmten Bereich im B-Scan optimiert werden.

3.6 Technische Charakterisierung

3.6.1 Bestimmung von Dynamik und Sensitivität

Zur experimentellen Bestimmung des Dynamikbereiches wurde das Spektrometer mit einem Spiegel im Probenarm so angesteuert, dass eine maximale Signalamplitude erreicht wurde. Im Anschluss wurde die maximale Signalhöhe in einem 20-fach inkohärent gemittelten A-Scan bestimmt. Um den Einfluss des durch den Roll-Off gegebenen Abfall der Signalhöhe mit der Messtiefe zu minimieren, wurde das Signal des Spiegels bei ca. 10% des Tiefenmessbereiches positioniert. Das Grundrauschen wurde neben dem Signalpeak bei ca. 20% des Tiefenmessbereiches bestimmt. (Abb. 3.13a). Aus der maximalen Signalamplitude $i_{D,dB} = 57,0$ dB und dem durchschnittlichen Rauschen $\bar{\sigma} = 1,7$ dB wurden der Dynamikbereich für das mOCT-System $SNR_{Dynamic} = 55,3$ dB bestimmt. Für die im Spektrometer verbaute Kamera (Sprint SpL4096, 140km, Basler AG, Ahrensburg, Deutschland) gibt der Hersteller eine Sättigungsladung von $n_e = 18000 e^-$ und ein Detektorrauschen von $\sigma_{det} = 26 e^-$ an [96]. Die vom Spektrometer detektierte spektrale Leistungsdichte ist nicht gleichgewichtet, sondern fällt zu den Randbereichen ab. Für die Berechnung des Dynamikbereiches soll die Form des Spektrums durch eine Hann-Funktion angenähert werden, dessen Fläche unter der Kurve der Hälfte der eines Rechteckes entspricht. Daher reduziert sich die Anzahl der Ladungsträger um den Faktor zwei. Für den Fall,

dass das Photonenrauschen und das Detektorrauschen die einzigen Rauschquellen sind, kann die maximale Dynamik des mOCT abgeschätzt werden durch

$$SNR_{FWC} = 20 \left(\log_{10} \left(\frac{n_{FWC}}{8} \cdot \sqrt{N} \right) - \log_{10} \left(\sqrt{\frac{n_{FWC}}{4} + \sigma_{det}^2} \right) \right). \quad (3.9)$$

Dadurch ergibt sich ein maximal zu erwartender Dynamikbereich des mOCT von $SNR_{Dynamik} = 63$ dB, welcher 8,3 dB größer ist, als der messtechnisch bestimmte Wert. Die schlechtere Dynamik ist zurückzuführen auf das zusätzliche spektrale Rauschen der Superkontinuum-Quelle, wie in vorherigen Studien gezeigt wurde [97, 86]. Aufgrund fehlender Herstellerangaben wurde dies in der Abschätzung der Dynamik vernachlässigt.

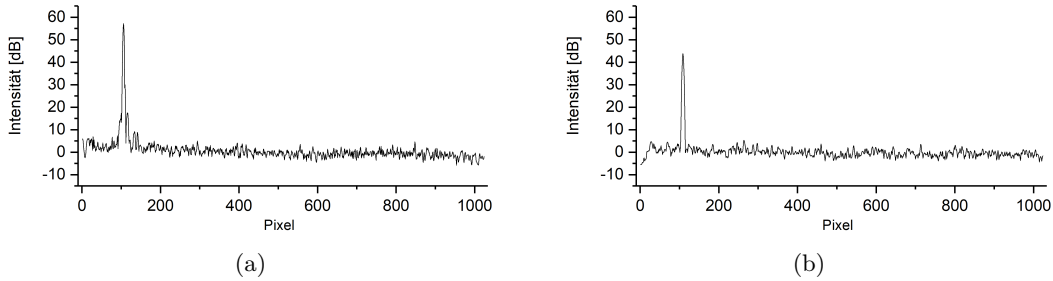


Abbildung 3.13: A-Scans zur Bestimmung der maximalen Signalamplitude und des durchschnittlichen Rauschens für die Berechnung des Dynamikumfangs (a) und der Sensitivität (b) des mOCT.

Die Sensitivität wurde aus dem OCT-Signal einer dielektrischen Oberfläche eines Keilprismas mit definierter Reflektivität R_{sample} bestimmt. Um Übersteuerung zu vermeiden, wurde das Signal mit Graufiltern der optischen Dichte $OD = 1,1$ abgeschwächt. Die Sensitivität ergibt sich aus dem SNR (erster Term), Reflektivität der Oberfläche (zweiter Term) und der Abschwächung des Filters (dritter Term) nach

$$Sens_{max} = 20 \cdot (\log_{10}(i_D) - \log_{10}(\sigma)) - 10 \cdot \text{Log}_{10}(R) + 20 \cdot OD. \quad (3.10)$$

Die Reflektivität der Oberfläche des Keilprismas wurde mit den Fresnelschen Formeln bestimmt. Bei der Zentralwellenlänge von $\lambda = 750$ nm betrug der Brechungsindex $n_1 = 1.5118$ für das Keilprisma und $n_2 = 1.3291$ für das aus destilliertem Wasser bestehende Immersionsmedium. Für die Reflektivität des Keilprismas ergibt sich somit

$$R_{Wedge} = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2 = 4,1 \cdot 10^{-2}. \quad (3.11)$$

Mit einer Signalamplitude von $i_{D,dB} = 44,0$ dB gemessen und einem durchschnittlichen Rauschen von $\bar{\sigma} = 0$ dB (Abbildung 3.13b) ergab sich die Sensitivität $Sens_{max} = -90,5$ dB bei einem Strahlungsfluss von 21 mW auf der Probe.

Um die maximal mögliche Sensitivität abzuschätzen, wurde eine über alle Kanäle gemittelte Quanteneffizienz $\eta = 46$ % und die Belichtungszeit $\tau_i = 5,4 \cdot 10^{-6}$ s des

Spektrometers angenommen. Für einen Strahlungsfluss von 21 mW auf der Probe ist eine maximale Sensitivität von -106 dB zu erwarten, ca. 14 dB besser als gemessen wurde.

3.6.2 Bestimmung des Bildfeldes und der lateralen Auflösung

Das mOCT wurde innerhalb dieser Arbeit mit den folgenden drei Mikroskop-Objektiven verwendet

- 5x/0,16 NA Mikroskop-Objektiv
(EC Plan-Neofluar, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- 20x/0,5 NA Mikroskop-Objektiv
(HCX APO L 20x/0,50 WUVI, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- 40x/0,8 NA Mikroskop-Objektiv
(Achroplan W, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Das maximale Bildfeld wurde mit einem Gitter, das im Fokus des Objektivs platziert wurde, für jedes der drei Objektive als vignettierungsfreier Bereich im En-face-Bild bestimmt. Die Maximalintensitätsprojektionen (MIP) des aufgenommenen Gitters sind für die drei verwendeten Objektive in Abbildung 3.14a-c dargestellt. Aus diesen Aufnahmen ergeben sich jeweils Bildfelder von 6,0 mm x 5,0 mm, 2,2 mm x 2,1 mm und 0,6 mm x 0,8 mm. In allen Bildern ist eine ovale Vignettierung auszumachen. Aufgrund der Anordnung der Galvanometer-Spiegel in dem Aufbau kann die Apertur-Ebene nur in einer der beiden Spiegel-Ebenen – in diesem Fall wurde die schnelle Achse ausgewählt – abgebildet werden. Dies erzeugt die unsymmetrische Vignettierung.

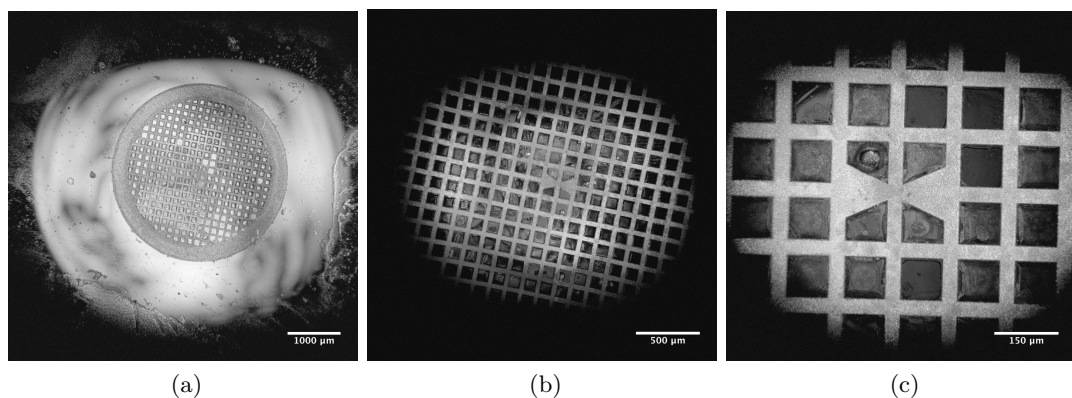


Abbildung 3.14: Die Maximalintensitätsprojektionen (MIP) der Volumenbilder eines Gitters, die mit den drei verwendeten Objektive (5x/0,16, 20x/0,5 und 40x/0,8) aufgenommen wurden. Die Größe des Bildfeldes wurde aus dem vignettierungsfreien Bereich bestimmt.

Für jedes dieser Objektive wurde die laterale Auflösung anhand von Nanopartikeln (40 nm, Fluospheres, ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, USA), welche in einem Sylgard Polymer (Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) eingebettet wurden, bestimmt. Dazu wurde in der Fokusebene, in der das Signal der Streuer am größten ist, die FWHM des En-face-Bildes einzelner Partikel nach Anpassung einer Gaußfunktion an das lineare OCT-Signal (Streuintensität) mittels der Analysesoftware Origin (Origin2017G, OriginLab Corporation, Northhampton, USA) bestimmt. Für jedes Objektiv wurde dies an jeweils fünf Bildern von Partikeln durchgeführt. Für das mOCT sind die Ergebnisse der Messung in Abbildung 3.15 dargestellt. Aus den Messungen ergeben sich jeweils Halbwertsbreiten der Punktbildfunktionen von $1,85 \mu\text{m}$ für das $5\times/0,16$ NA Objektiv, $0,70 \mu\text{m}$ für das $20\times/0,16$ NA Objektiv und $0,36 \mu\text{m}$ für das $40\times/0,8$ NA Objektiv. Gegenüber der auf Grundlage der spezifizierten NA's Auflösungen von $1,73 \mu\text{m}$, $0,56 \mu\text{m}$, und $0,34 \mu\text{m}$ ergeben sich Abweichungen von 2% bis 20% , welche sich durch die Beleuchtung mit einem radial abgeschnittenen Gaußstrahl erklären lassen.

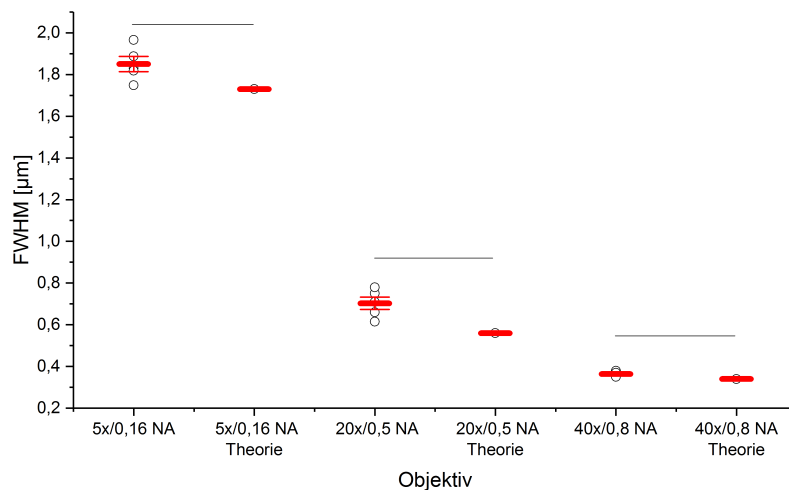


Abbildung 3.15: Laterale Auflösung des mOCT, gemessen als Halbwertsbreite (FWHM) des En-face-Bildes von einzelnen Partikeln, jeweils für das $40\times/0,8$ NA, $20\times/0,5$ NA und $5\times/0,16$ NA Mikroskop-Objektiv im Vergleich zu der auf Grundlage der spezifizierten NA's erwarteten Auflösungen.

3.6.3 Bestimmung von Aberrationen im emOCT

Um den Einfluss von Aberrationen auf die OCT-Bildentstehung zu untersuchen, wurden die monochromatischen Aberrationen des zur Abbildung verwendeten GRIN-Endoskops mit einem Shack-Hartmann Sensor (WFS150-5C, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) vermessen. Das Endoskop wurde zusammen mit der Scanoptik mittels einer Superluminescence Diode (BLM-S-840-B-I-20, Superlum, Dublin, Ireland) bei einer Zentralwellenlänge von 840 nm beleuchtet. Das Licht im Fokus wurde

durch ein gut charakterisiertes Mikroskopobjektiv, welches nahezu aberrationsfrei ist, auf den Shack-Hartmann Sensor kollimiert.

Die chromatischen Längsaberrationen wurden mittels eines Goldspiegels, welcher auf einem motorisierten Hubtisch (Labjack MJL050, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) platziert wurde, bestimmt. Für die Messung wurde der Referenzarm geblockt. Spektren wurden aufgezeichnet, während der Goldspiegel in 1 μm Schritten durch den Fokus gefahren wurde. Die Fokusverschiebung wurde dann im Anschluss aus der Spiegelposition, für die die Signalintensität im jeweiligen Spektralkanal maximal wurde, bestimmt.

3.6.4 Bestimmung der axialen Auflösung

Messungen der axialen Auflösung wurden mit dem 5x/0,16 Objektiv an einer Glasoberfläche durchgeführt. Zur Analyse der axialen PSF wurde an das lineare OCT-Signal eine Gaußkurve angepasst und aus den Fit-Parametern die FWHM bestimmt.

3.6.4.1 Einfluss der Dispersion

Neben der optischen Dispersionskompensation wurde auch eine numerische Korrektur während der Datenprozessierung durchgeführt, um eine maximale bandbreitenbegrenzte Tiefenauflösung zu erzielen. Um die Wirksamkeit der numerischen Dispersionskorrektur (Abschnitt 3.5) zu demonstrieren, wurde eine Optimierung der Bildqualität unter Berücksichtigung verschiedener Ordnungen des Phasenfehlers durchgeführt und der Einfluss auf die Breite der axialen PSF quantitativ evaluiert. Abbildung 3.16a zeigt die axiale PSF des Aufbaus, die an einer dielektrischen Oberfläche erstellt wurde. Ohne numerische Dispersionskorrektur beträgt die FWHM 110 μm . Nach Kompensation der zweiten Ordnung lässt sie sich fast auf ein Zwanzigstel, 2,1 μm , reduzieren. Die axiale PSF (Abb. 3.16b) ist hier unsymmetrisch und in Richtung der Nulllinie verbreitert. Nach Anwendung der Dispersionskorrektur bis zur 3. Ordnung (Abb, 3.16c) beträgt die FWHM dann nur noch $d_{z_{3.Ordung}} = 1,3 \mu\text{m}$. Neben einer Reduzierung der Breite um mehr als die Hälfte gegenüber der Kompensation bis zur 2. Ordnung ist nur noch eine leichte Unsymmetrie zu erkennen. Eine numerische Dispersionskorrektur bis zur 4. Ordnung (Abb, 3.16d), bringt keine weitere Reduzierung der Halbwertsbreite. Die Ursache für die leichte verbleibende Unsymmetrie liegt in einer unvollkommenen Normierung des Spektrums. Vor der Fensterung des Signals wird das Spektrum normiert, indem durch das vorher aufgezeichnete Referenzspektrum geteilt wird. Ändert sich nun z. B. durch Rauschen der Lichtquelle die Leistungsdichteverteilung des Spektrums, so ist die Normierung nicht mehr exakt. Die Anwendung der Fensterung führt dann dazu, dass die Einhüllende nicht die Form des Hann-Fensters hat, was auch nach der Fouriertransformation zu Abweichungen von der gewünschten Form führt.

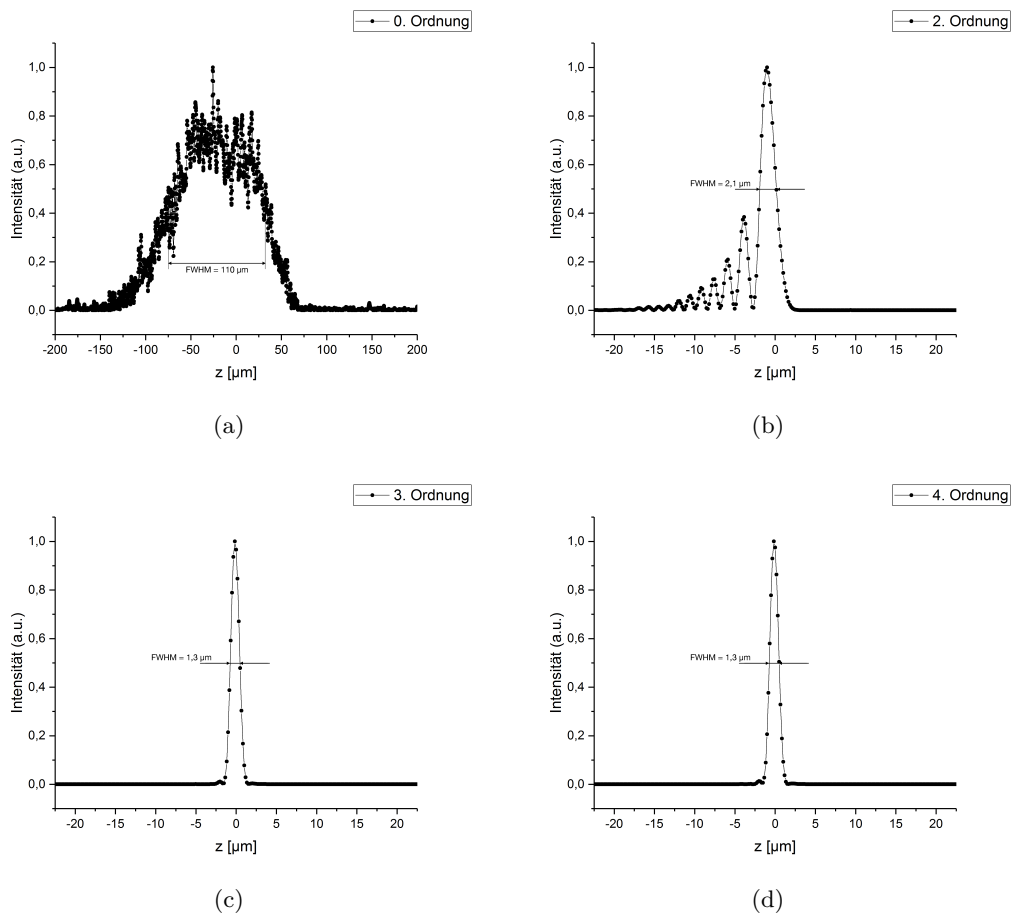


Abbildung 3.16: Einfluss der Dispersionskorrektur auf die axiale Auflösung für den unkorrigierten Fall (a), die Korrekturen der 2. Ordnung (b), 3. Ordnung (c) und der 4. Ordnung. Dargestellt ist eine Messung der Reflexion an einer dielektrischen Oberfläche nach den verschiedenen Korrekturen der Dispersion.

3.7 Simulation der Bildentstehung

Das Ziel der Simulation der mOCT-Bildgebung ist es, den Einfluss von sphärischen und chromatischen Längsaberrationen auf die Auflösung und Bildqualität zu simulieren. Die hier verwendeten Algorithmen wurden in einer Masterarbeit [72] ausführlich beschrieben. Hier soll nur kurz das Prinzip dargestellt werden.

Wegen der konfokalen Eigenschaften von abtastenden, faserbasierten OCT-Systemen, bei denen die verwendete Singlemode-Faser als Pinhole dient, wurde die Bilderzeugung als eine Erweiterung der Theorie der Bilderzeugung in der konfokalen Reflexionsmikroskopie beschrieben. Nach der Bestimmung des konfokalen Bildes wurde das OCT-Bild über die multispektrale Interferenz mit der Referenzwelle berechnet. Um die komplexe PSF $u(x,y,z)$ zu erhalten, wurde das Lichtwellenfeld ausgehend von der rückwärtigen Brennebene in die Objektebene propagiert (Abb. 3.17).

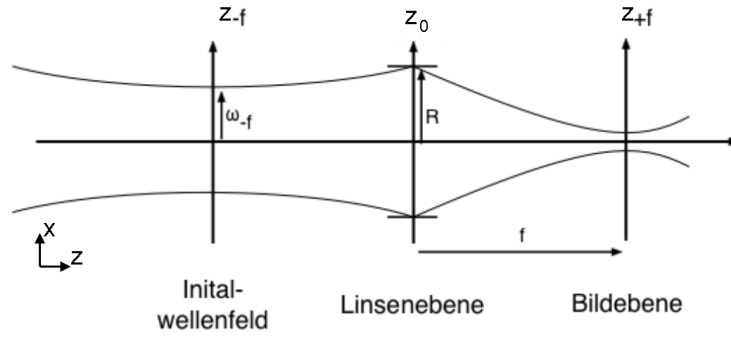


Abbildung 3.17: Erläuterung zur Simulation des Einflusses von Bildfehlern auf die mOCT-Bildgebung.

Als Startpunkt für das initiale Wellenfeld $u_{ini}(x,y,z = -f)$ wurde die rückwärtige Brennebene $-f$ der simulierten Linse gewählt. Von dort aus wurde das Feld propagiert. Für das Wellenfeld direkt vor der Aperturebene ($z = -0$) gilt dann

$$u(x,y, -0) = \iint \tilde{u}_{ini}(k_x, k_y; z_{-f}) e^{i(k_x x + k_y y + k_z z)} dk_x dk_y \quad (3.12)$$

mit $\tilde{u}_{ini}(k_x, k_y; z_{-f})$, dem Winkelspektrum des initialen Wellenfeldes. Fokussierende Optik und deren Aberrationen wurden durch eine komplexe Amplituden- transmissionsfunktion $T(x,y)$, berücksichtigt, mit der das in die Aperturebene propagierte Lichtwellenfeld multipliziert wurde [75]. Die chromatischen Längsaberrationen wurden durch eine von der Wellenzahl abhängige Brennweite $f(k)$ der fokussierenden Linse implementiert. Für das Lichtwellenfeld direkt nach der Aperturebene ($z = +0$) folgt

$$u(x,y; +0) = T(x,y) \cdot u(x,y, -0) \quad (3.13)$$

$$\text{mit } T(x,y,z) = \underbrace{\text{circ}\left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{R}\right)}_{\text{Apertur}} \cdot \underbrace{e^{-ik\sqrt{f(k)^2 + x^2 + y^2}}}_{\text{Linse}} \cdot \underbrace{e^{-ikW(\eta;\rho,\theta)}}_{\text{Wellenfrontaberrationen}}.$$

Über eine weitere Propagation wird das Lichtwellenfeld in die gewünschten Zielebenen z propagiert, um dort die komplexen PSF $\check{p}(x,y,z,k)$ zu berechnen. Diese ist somit gegeben durch

$$\check{p}(x,y,z,k) = \iint \tilde{u}(k_x, k_y; +0) e^{i(k_x x + k_y y + k_z z)} dk_x dk_y \quad (3.14)$$

mit $\tilde{u}(k_x, k_y; +0)$, der Winkelspektrumrepräsentation des Lichtwellenfeldes direkt nach der Aperturebene (Gl. 3.13). Die konfokale Amplitude PSF wurde dann durch Quadrieren der komplexen PSF berechnet (siehe 2.41). Für jede Ebene z wurde das komplexe Amplitudenbild durch Faltung der konfokalen Amplitude PSF mit der Objektstruktur $r(x,y,z)$, welche eine Zufallsphase zur Simulation einer diffusen Rückstreuung enthielt, gebildet. Das gesamte Amplitudenbild $U(x,y,k)$ wurde durch

die Summenbildung über alle Tiefenebenen z

$$U(x,y,k) = \sum_z \iint \check{p}(x,y,z,k)^2 \cdot r(x' - x, y' - y, z) dx' dy'. \quad (3.15)$$

gebildet. Die Addition der Referenzphase $e^{ik2\Delta z}$ in jedem Spektralkanal k des Spektrometers simulierte die Interferenz mit dem Referenzstrahl, der einen optischen Weglängenunterschied von $2\Delta z$ zu z_0 besitzt. Das Interferenzspektrum ergab sich dann durch die Betragsquadratbildung in jedem einzelnen Spektrometerkanal:

$$E_e(x,y;k) = \left| U + \exp^{ik2\Delta z} \right|^2 + N_P \quad (3.16)$$

Um ein realistisches Signal zu erzeugen, wurde im Anschluss in jedem Spektralkanal Poisson-Rauschen N_p addiert. Die Berechnung des A-Scans erfolgte im Wesentlichen durch Verarbeitung der Spektrogramme, wie sie für gemessenen Daten durchgeführt wurde und in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist. Lediglich auf die Reskalierung und Dispersionskorrektur konnte verzichtet werden. Alle Berechnungen wurden mit Matlab (Matlab2015a, Mathworks, Natick, MA, USA) ausgeführt.

3.8 Messungen am Tiermodell

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Institut für Anatomie und im Einklang mit dem deutschen Recht durchgeführt. Präparation der Tiere und die Überwachung der Anästhesie erfolgten durch einen Mitarbeiter des Instituts für Anatomie.

Für die Experimente wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 kurz Black-6 (Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit und ohne genetisch verändertem Phänotyp verwendet. Bei den genetisch veränderten handelt es sich um β -ENaC überexprimierte Mäuse, ein Tiermodell welches die Symptome der CF aufweist und geeignet ist Hydratisierung und Transport des Schleims zu untersuchen. Das Atemwegsepithel dieser Tiere weist eine Erhöhung der NA^+ Absorption auf, welche zu einer Reduzierung der ASL von $5,9 \mu m$ auf $3,8 \mu m$ [98] und Veränderung der Mukuszusammensetzung durch Entzug von Wasser führt. Bei diesem Tiermodell wird eine massive Hemmung der mukoziliaren Reinigung ähnlich wie beim Menschen beobachtet. Die verminderte Hydratation des Schleims kann sogar zu einer Verlegung des Larynx führen, was bei den Mäusen zu einer Mortalität von 50 % innerhalb der ersten 14 Lebenstage führt [31].

Für die Studie wurden Mäuse im Alter von vier bis sechs Wochen verwendet, welche im spezifischen pathogenfreien (SPF) Tierstall des Universitätsklinikums Heidelberg gezüchtet wurden. Eine Überführung in den SPF Tierstall der Universität zu Lübeck erfolgte in einem Alter von 3 Wochen. Die Studien zum Mukustransport bzw. Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen wurden von den schleswig-holsteinischen Landesbehörden nach Antrag durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie genehmigt (Nr. V242-7224.122-1).

3.8.1 Ex vivo und in vivo Messungen im Wildtyp

3.8.1.1 Morphologische Darstellung von Trachealgewebe

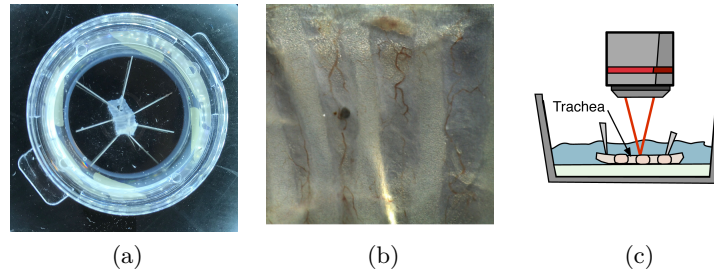


Abbildung 3.18: (a) Kurz nach Tötung entnommene (*ex vivo*) Trachea wurde für mOCT Messungen mit Insektennadeln in eine mit Silikon ausgegossene Petrischale immobilisiert. (b) Detailaufnahme der Trachea. (c) Schematische Abbildung der Messgeometrie.

An aus genetisch nicht veränderten Mäusen entnommenem (*ex vivo*) Trachealgewebe wurde die Darstellungsmöglichkeit verschiedener morphologischer Strukturen mit den drei verschiedenen Objektiven evaluiert. Die Trachea wurde der Maus *post mortem* entnommen und entlang der *Parietes membranaceus* aufgeschnitten. Proben und Messgeometrie sind in Abbildung 3.18c dargestellt. Die entfaltete Trachea wurde mit Insektennadeln in einer mit Silikon (Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) ausgegossenen Petrischale so fixiert, dass das Zilien tragende Epithel nach oben in Richtung Objektiv positioniert ist. Im Anschluss wurde die Petrischale mit Hepes Pufferlösung aufgefüllt. Das Experiment wurde bei Raumtemperaturen zwischen 20 °C und 24 °C durchgeführt. Mit jedem der drei getesteten Objektive wurden die Proben nacheinander an den gleichen, repräsentativen Stellen vermessen. Die Petrischale mit der präparierten Trachea wurde dazu unter dem Objektiv platziert. Die Position der Petrischale wurde zwischen dem Wechsel der Objektive nicht bewegt. Für jedes Objektiv wurden jeweils fünf Volumen aufgezeichnet, wobei die Fokusebene ausgehend von den Zilien in 25 µm Schritten von Aufnahme zu Aufnahme in die Gewebetiefe verfahren wurde.

Beginnend mit dem Objektiv mit der größten Vergrößerung (40x) wurde das kleinste Bildfeld von 0,5 mm ausgewählt. Für das Objektiv mit der mittleren Vergrößerung (20x) um den Faktor zwei auf 1,0 mm und für das 5-fach Objektiv mit der kleinsten Vergrößerung auf 2,0 mm vergrößert. Da es sich hierbei um ein Luftobjektiv handelte, wurde die Pufferlösung mit einer Pipette so weit abgenommen, bis die Oberfläche gerade noch bedeckt war, des Weiteren wurde auf eine Verschiebung des Fokus verzichtet, da die Fokuslage in den Bildern aufgrund des hohen Tiefenmessbereiches nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Für jede Fokusposition wurde ein En-face-Bild berechnet, indem symmetrisch um die Fokusebene herum eine Maximumintensitätsprojektion (MIP) über 5 Ebenen entlang der z-Achse mit dem Programm Fiji [99] berechnet wurde.

3.8.1.2 Quantifizierung der Zilienschlagfrequenz in der geöffneten und der geschlossenen Trachea

Für die Untersuchung des Zilienschlages an der offenen Trachea wurde diese, wie im Abschnitt (3.8.1.1) beschrieben, präpariert. Für Messungen durch die ungeöffnete Trachealwand wurde die Trachea mit der *Paries membranaceus* nach unten ebenfalls mit Insektennadeln in einer mit Silikon ausgegossenen Petrischale fixiert. Die Petrischalen wurden im Anschluss mit einer Hepes-Pufferlösung aufgegossen. Schematisch ist die Messgeometrie in Abbildung 3.19 dargestellt.

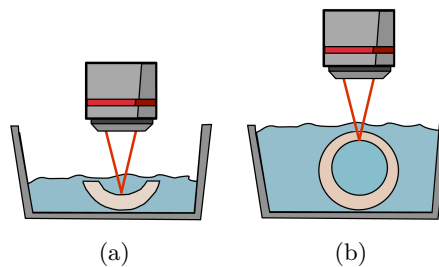


Abbildung 3.19: Versuchsaufbau für die Zilienschlag Messung an der offenen (a) beziehungsweise der geschlossenen Trachea (b).

Das Ziel der ersten Messreihe war die Darstellbarkeit von Zilienschlag zu validieren. Hierfür wurden Messungen bei Raumtemperatur mit dem 20x/0,5 NA Mikroskop-Objektiv durchgeführt. Von beiden Proben wurden dabei Zeitserien über 2,5 Sekunden mit einer Framerate von 80 B-Scans pro Sekunde aufgezeichnet. Die Zilienschlagfrequenz wurde analysiert, indem Grauwertänderungen über die Zeit pixelweise betrachtet wurden. Hierfür wurde ein Matlab Programm verwendet, welches in einer vorherigen Arbeit [100] angefertigt wurde.

Ausgangspunkt für die Analyse ist ein dreidimensionaler Datensatz $U(x\{1,\dots,N\},z\{1,\dots,M\},t\{1,\dots,S\})$, der neben den räumlichen Z und X Komponenten des B-Scans auch noch eine zeitliche Komponente S enthält. Für jede Z-X Koordinate wird nun eine Fouriertransformation entlang der Zeitachse durchgeführt. Als Ergebnis liegt für jede ZX Koordinate ein Spektrum $\tilde{u}(x\{1,\dots,N\},z\{1,\dots,M\},t\{1,\dots,S/2\})$ vor, welches Informationen über die Grauwertvariation enthält. In einem nächsten Schritt wird die jeweils dominierende Frequenz in jedem Spektrum bestimmt. Um das Rauschen zu unterdrücken, werden nur solche dominierenden Frequenzen ausgewählt, deren Amplituden einen gewissen Grenzwert überschreiten. In einem letzten Schritt wird nun basierend auf der Z-X Koordinate ein Frequenz farbcodierter B-Scan erstellt (Abb. 3.20).

3.8.1.3 Analyse der Transportmechanismen in der Maus

Für die Analyse der Transportmechanismen *in vivo* wurden Mäuse durch eine intra-peritoneale Injektion von 500 μl 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fentanyl (Janssen, Neuss, Deutschland), 48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medetomidine (Pfizer, Berlin, Deutschland) und 0,48 mg/ml Midazolam

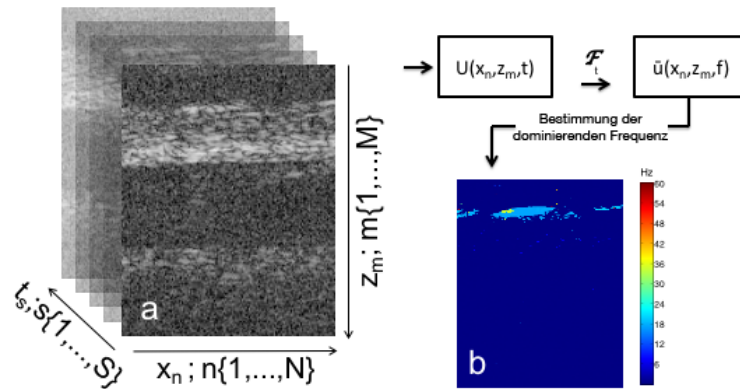


Abbildung 3.20: Räumlich aufgelöste Berechnung der Zilienschlagfrequenz aus Serien von B-Scans.

(AlleMan Pharma GmbH, Rimbach, Deutschland) in 0,9 % NaCl unter Beibehaltung der Spontanatmung anästhetisiert. Die *Trachea ventral* wurde von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie vom Larynx ausgehend bis kurz vor dem distalen Ende der Trachea (*bifurcatio trachea*) freipräpariert. Die darüber liegende Haut wurde entfernt, submandibulären Drüsen verdrängt und die infrahyoide Muskulatur ebenfalls entfernt. Die Maus wurde auf einer kardanisch aufgehängten, auf 37 °C temperierten Wärmeplatte platziert und an den Gliedmaßen immobilisiert. Kopfseitig wurde die Maus mittels eines Fadens an den Schneidezähnen fixiert, sodass die Möglichkeit gegeben war, den Hals leicht zu überstrecken.

Die Visualisierung und Analyse der Transportmechanismen wurden mit dem 20x/0,5 Objektiv durchgeführt. Zeitserien mit einer Geschwindigkeit von 80 B-Scans pro Sekunde wurden vor, während und nach nasaler Applikation von 30 μ l isotoner Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) durchgeführt. Um die Transportvorgänge besser visualisieren und die Geschwindigkeiten quantifizieren zu können, wurden bei einem Teil der Experimente der isotonen Kochsalzlösung Polystyrol-Nanopartikel (Fluoresbrite YG Microspheres 200 nm, Polysciences, Inc., Eppelheim) beigelegt.

3.8.2 Tierstudie zur Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen

3.8.2.1 Experimenteller Aufbau

Für Untersuchungen der Hydratisierung von Schleim durch Kochsalzlösung wurden 5 β -ENaC überexprimierten Mäusen 30 μ l isotoner (0,9 % NaCl) und 5 weiteren Mäusen 30 μ l hypertoner (0,9 % NaCl) Kochsalzlösung nasal appliziert. Als Kontrollgruppe dienten dabei jeweils 5 nicht genetisch veränderte Mäuse, welche gleichbehandelt wurden. Die mOCT Aufnahmen wurden mit dem 5x/0,16 NA Mikroskop-Objektiv in einem Bildfeld von 5 mm Breite und 0,7 mm Tiefe durchgeführt. Für die gesamte Studie wurde folgendes Messprotokoll angewendet.

- Vor der Gabe von Lösung zur Simulation einer therapeutischen Intervention wurden sekundlich 5 B-Scans mit einer Bildrate von 80 B-Scans pro Sekunde über einen Zeitraum von 5 – 10 min aufgezeichnet. Dies diente der Generierung von Ausgangsdaten über den Schleimtransport.
- Anschließend erfolgte nasale Applikation, während der eine Zeitserie mit einer Länge von ca. 30 s mit einer Bildrate von 80 B-Scans pro Sekunde aufgenommen wurde.
- Zur weiteren Untersuchung des Effektes wurde eine Langzeitmessung über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde durchgeführt, wobei sekundlich 5 B-Scans aufgezeichnet wurden.

3.8.2.2 Verifikation der Trachea Blockierung

Zur Verifikation der zeitweise beobachteten Verlegung der Trachea durch Schleim wurden exemplarische Messungen mit einem OCT-System bei 1300 nm Wellenlänge (TelestoV1, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) an den β -ENaC überexprimierten Mäusen durchgeführt. Die laterale und axiale Auflösungen betragen bei diesem System nur 15 μm beziehungsweise 7 μm . Mit diesen Auflösungen kann das Telesto V1 die Mukusdicke nicht exakt messen aber wegen der hohen Messtiefe von 2,5 mm den Mukus über den gesamten Durchmesser der Trachea visualisieren. Für die Messung wurde die Maus samt Wärmeplatte unter dem OCT-Scankopf (OCTG-1300, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) platziert. Es wurden Zeitserien mit einer Geschwindigkeit von bis zu 60 fps aufgezeichnet.

3.9 Messung an humanem Gewebe aus der Nase

Humanes Nasengewebe für *ex vivo* Messungen wurde von der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bereitgestellt. Bei den Proben handelte es sich um Gewebe der *Concha nasalis*, welche während einer geplanten Septumplastik bei den Patienten entnommen und in einem Zeitfenster von weniger als drei Stunden vermessen wurde. Die *Concha nasalis* wurde mit dem zilientragenden Epithel nach oben in einer mit einem Sylgard Polymer (Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) ausgegossenen und Hepes-Puffer gefüllten Petrischale mit Insektenadeln immobilisiert. Zur späteren Verifikation von morphologischen Strukturen wurden von der *Concha nasalis* mit Methylenblau-Azur II gefärbte histologische Schnitte im Semi-Dünnschnitt Verfahren angefertigt.

Die Entnahme und Verwendung der Proben für die Forschung wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Antrag Nr. 04.158) genehmigt.

3.9.1 In Vivo Messungen an der humanen Nase

In vivo Messungen wurden an gesunden, freiwilligen Probanden durchgeführt. Das Endoskop wurde hierfür ohne lokale Anästhetika in die Nase bis hin zur *Concha na-*

salis media eingeführt. Zur Anpassung des Brechungsindex und Reduktion von Irritationen des Epithels wurde ein Tropfen Vidisic ED0 (Bausch + Lomb Incorporated, Berlin, Deutschland) auf der Spitze des Endoskops platziert. Zeitserien mit einer Geschwindigkeit von 80 B-Scans pro Sekunde wurden mit der ThorImage Software aufgezeichnet. Zur besseren Kontrolle wurde ein Fußschalter (KKmoon USB Game Foot Control Keyboard Action Switch Pedal HID, Shenzhen Tomtop Technology Co Ltd, Shenzhen, China) implementiert. Die Nachbearbeitung der gemessenen B-Scans beinhaltete eine Mittelung mehrerer B-Scans und, wenn nötig, eine rigide Registrierung, welche mit der OpenSource Software Fiji [99] durchgeführt wurde.

4 Kapitel 4

4 Ergebnisse

4.1 Messung am Tiermodell

4.1.1 Ex vivo und in vivo Messungen im Wildtyp

Mit einer räumlichen Auflösung von wenigen Mikrometern ist die mOCT in der Lage, zelluläre und subzelluläre Strukturen darzustellen und damit zelluläre Gewebemorphologie und Mukustransport zu visualisieren. Hierfür stehen verschiedene Objektive zur Verfügung, welche sich in ihrer NA und dem maximalen darstellbaren Bildfeld unterscheiden. Anhand von entnommenem Trachealgewebe der Maus sollten die Darstellungsmöglichkeit der morphologischen Strukturen mit den verschiedenen Objektiven evaluiert werden. Hieraus sollte abgeleitet werden, welches Objektiv für verschiedene Anwendungen am besten geeignet ist.

4.1.1.1 Morphologische Darstellung von Trachealgewebe

Abbildung 4.1 zeigt En-face- und Querschnittsbilder von Maustrachea, welche mit den drei verschiedenen Objektiven aufgenommen wurden. Die En-face-Bilder zeigen Ebenen, in denen Zilien enthalten sind. Bei der höchsten Auflösung NA 0,8 (Abb. 4.1a) ist die zelluläre Matrix der Epithelzellen (ep) deutlich zu erkennen. Die Zilien tragenden (ci) Epithelzellen können in einer hohen Detailtreue visualisiert werden. Allerdings zeigten sie sich nur artefaktfrei in Bereichen, wo die Zilien nicht mehr schlagen (d-ci). Im B-Scan sind einzelne zelluläre Strukturen sowie die zelluläre Matrix nicht differenzierbar. Lediglich diejenigen Zilienbüschel sind sichtbar, die exakt im Fokus liegen. Die Intensität des OCT-Signals nimmt in der Tiefe schnell ab und 10 μm unterhalb des Fokus sind nur noch große Strukturen wie Lymphgefäße (lv) sichtbar.

Bei mittlerer Vergrößerung (NA 0,5) in Abbildung 4.1b sind die Epithelzellen nicht ganz so deutlich zu differenzieren. Neben dem Zilien tragenden Epithel sind aufgrund der gekrümmten Oberfläche im Randbereich auch die *Lamina propria* und Knorpelzellen zu erkennen. Wegen der höheren Tiefenschärfe fällt die Abnahme der Signalintensität im B-Scan geringer aus. Auch außerhalb des Fokus sind kleinere Strukturen wie z. B. die Knorpelzellen (ca) gut sichtbar.

Bei der niedrigsten Vergrößerung (NA 0,16) sind die Epithelzellen nicht mehr voneinander zu differenzieren (Abb. 4.1c). Auch die Zilien tragenden Zellen sind nur noch schwer erkennbar.

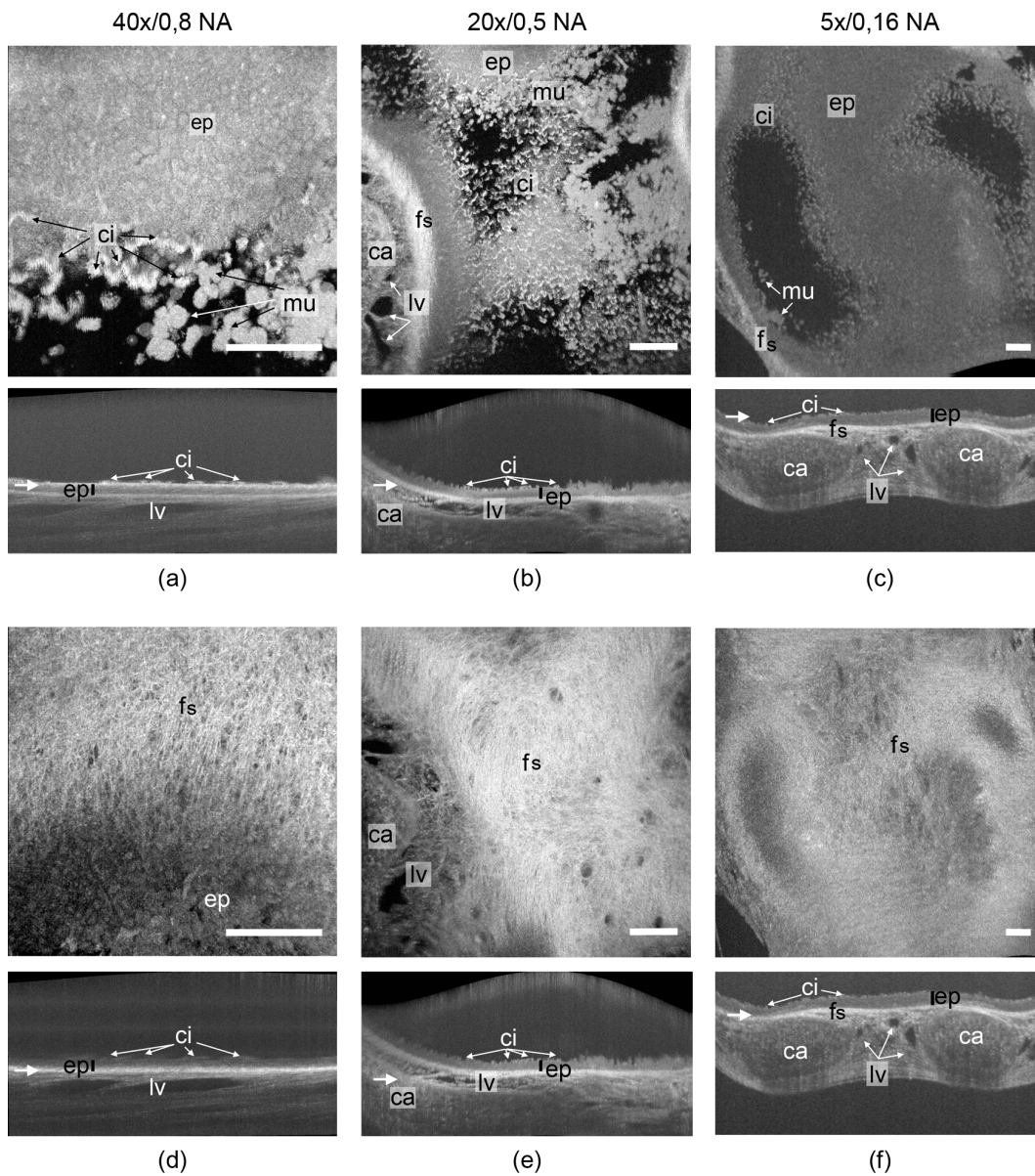


Abbildung 4.1: OCT-Volumenaufnahme von Trachea *ex vivo*. Die Bildgebung erfolgte mit drei unterschiedlichen Objektiven bei Fokussierung in vier unterschiedlich Tiefen (Pfeil). Fokussierung erfolgte auf die Ebene der Zilien (a-c), in die Ebene der *Lamina propria* (d-f), in den Bereich direkt unterhalb der *Lamina propria* (g-i) und in die Mitte der Trachealwand (j-l). Es wurden jeweils das 40x/0,8 NA Zeiss Objektiv (linke Spalte), das 20x/0,5NA Leica Objektiv (mittlere Spalte) und das 5x/0,16NA Zeiss Objektiv (rechte Spalte) verwendet. Morphologische Strukturen wie Zilien (ci), Epithelzellen (ep), Mukus (mu), Lymphgefäße (lv), Blutgefäße (v), Knorpelzellen (ca), Kollagen- und Elastinfasern (fs) und einzelne Erythrozyten (ec) sind deutlich zu erkennen.

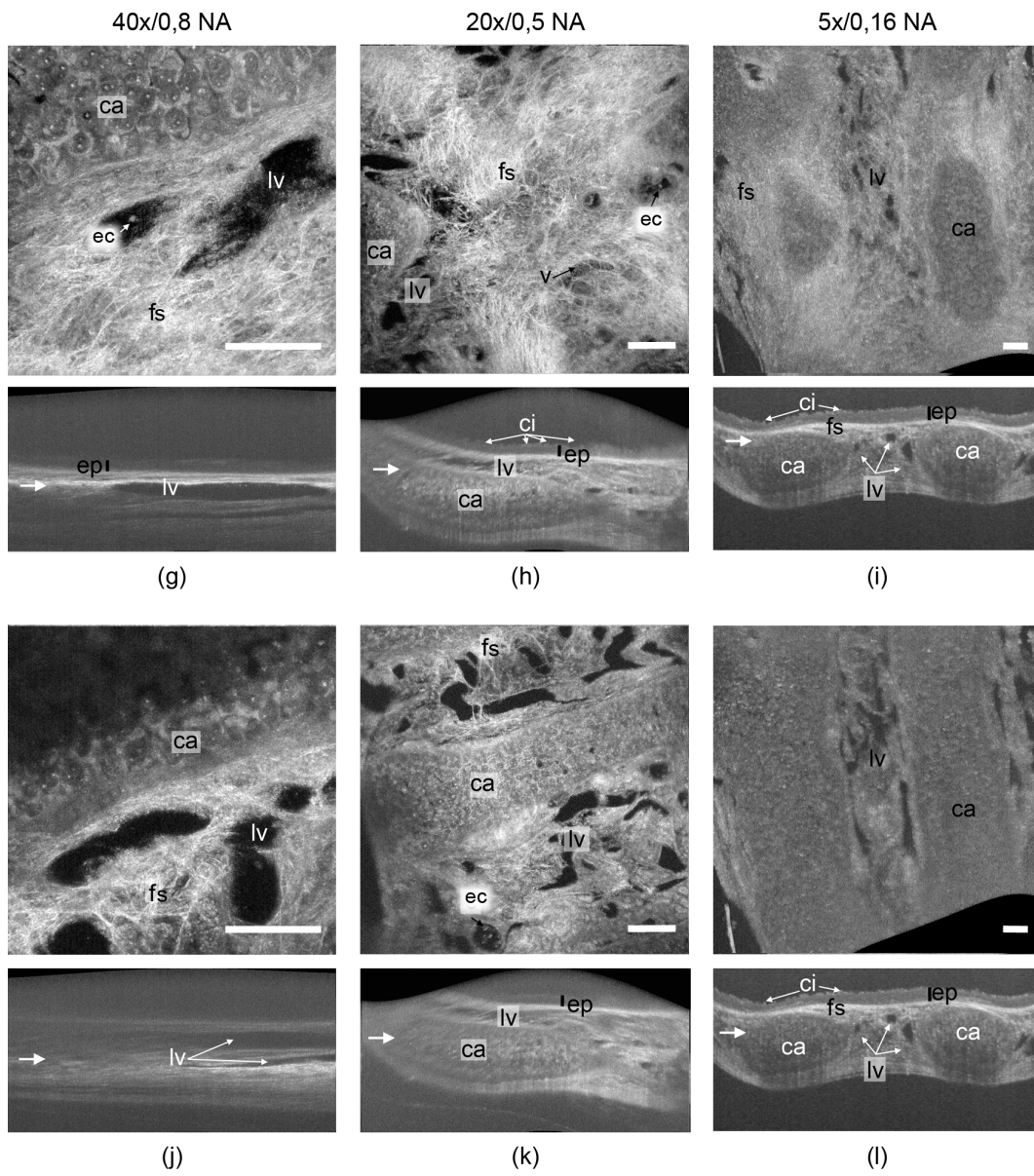


Abbildung 4.1: cont.

Dafür kann die Trachealwand im B-Scan über die gesamte Tiefe visualisiert werden. Auch wenn die extrazelluläre Matrix nicht in ihrer Feinstruktur dargestellt werden kann, so lassen sich die Bereiche mit den unterschiedlichen Zelltypen wie z. B. die Knorpelspangen, die *Lamina propria* und der Bereich der Epithelzellen gut voneinander differenzieren. Wird auf die etwas tiefer liegende *Lamina propria* fokussiert, werden bei 0,8 NA und 0,5 NA Faserstrukturen sichtbar. Eine Unterscheidung zwischen Kollagen- und Elastinfasern ist allein aufgrund der Rückstreuung in den OCT-Aufnahmen nicht möglich. Während bei 0,8 NA (Abb. 4.1d) und 0,5 NA (Abb. 4.1e) die Faserstrukturen ähnlich gut dargestellt werden, ist eine Separierung der Fasern bei NA 0,16 (Abb. 4.1f) nicht mehr möglich. Zilien sind in den B-Scans nicht sichtbar, da entweder die Auflösung im Fokus (0,16 NA und 0,5 NA) oder die Fokustiefe (0,8 NA) nicht ausreichen.

Unterhalb der *Lamina propria* treten die Knorpelzellen innerhalb der Spangen hervor. Zwischen den Knorpelspangen dominieren ungeordnete Faserstrukturen (fs), welche von Gefäßen durchzogen sind (Abb. 4.1g-i). Es sind sowohl Lymphgefäße, welche bis auf einzelne Zellen leer erscheinen, als auch Blutgefäße, welche mit Erythrozyten gefüllt sind, sichtbar. Die Darstellung der Strukturen ist auch hier bei NA 0,8 und 0,5 wieder sehr detailliert (Abb. 4.1g bzw. 4.1h), während es bei NA 0,16 (Abb. 4.1i) schwerfällt, Fasern und Zellen zu separieren.

Abbildung 4.1j-l zeigt die Volumen bei einer Fokussierung in die untere Hälfte der Trachealwand. Bei allen drei Auflösungen (Abb. 4.1j, 4.1k bzw. 4.1l) sind Unschärfen aufgrund von Aberrationen zu erkennen. Neue Strukturen sind bei Fokussierung in dieser Tiefe nicht mehr zu erkennen. Die Aufnahmen zeigen, dass die mOCT in der Lage ist, morphologische Strukturen auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu visualisieren. Eine NA von 0,16, ungefähr das Doppelte der typischerweise bei der OCT eingesetzten NA, konnte nur größere morphologische Strukturen, nicht aber Zellen oder Zellorganellen auflösen. Diese geringe NA ist vorteilhaft, wenn großflächige Übersichtsaufnahmen erwünscht sind.

Mit den beiden Immersionsobjektiven, welche eine NA von 0,5 bzw. 0,8 aufweisen, war eine sehr detaillierte Darstellung von zellulären und subzellulären Strukturen möglich. Bei Verwendung des 0,8 NA Objektivs hat sich bzgl. der Darstellbarkeit der verschiedenen Strukturen in der Trachea kein signifikanter Unterschied gegenüber dem 0,5 NA Objektiv gezeigt. Da die axiale Auflösung nur durch die spektrale Bandbreite des OCT-Systems bestimmt wird, können feine Schichtungen oder axiale Strukturänderungen unabhängig von dem gewählten Objektiv sehr gut visualisiert werden.

4.1.1.2 Beobachtung des Zilienschlages an der geöffneten bzw. geschlossenen Trachea

In dem vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die mOCT ein nützliches, bildgebendes Verfahren für die strukturelle Darstellung von respiratorischem Gewebe darstellt. Aufgrund der hohen Messgeschwindigkeit ist die mOCT auch für die Darstellung und Quantifizierung der komplexen Vorgänge bei der mukoziliären Reini-

gung geeignet. Wie in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, konnte der Zilienschlag bisher stets nur von der Lumenseite her dargestellt und quantifiziert werden. Hier soll anhand exemplarischer Messungen gezeigt werden, dass die mOCT in der Lage ist, den Zilienschlag auch durch die geschlossene Trachea hindurch zu visualisieren. Hierfür wurde die Trachea sowohl offen, als auch geschlossen als Rohr in einer Petrischale platziert und bei Raumtemperatur untersucht. Ein wichtiger Parameter für die Vitalität der Zilien stellt deren Schlagfrequenz dar. Die am häufigsten angewendete Methode zur Analyse des Zilienschlages ist eine pixelweise Auswertung zeitlicher Grauwertänderungen [8]. Hierfür wurde ein MATLAB Programm verwendet, welches im Rahmen einer Masterarbeit [100] erstellt worden war. Ausgangspunkt für die Analyse der Frequenz der Zilienbewegung ist eine zeitliche Serie von B-Scans. Für jedes Pixel wird die Fouriertransformation entlang der Zeitachse berechnet. Aus dem Spektrum wird die dominierende Frequenz mit der höchsten Amplitude bestimmt und farbcodiert im B-Scan dargestellt.

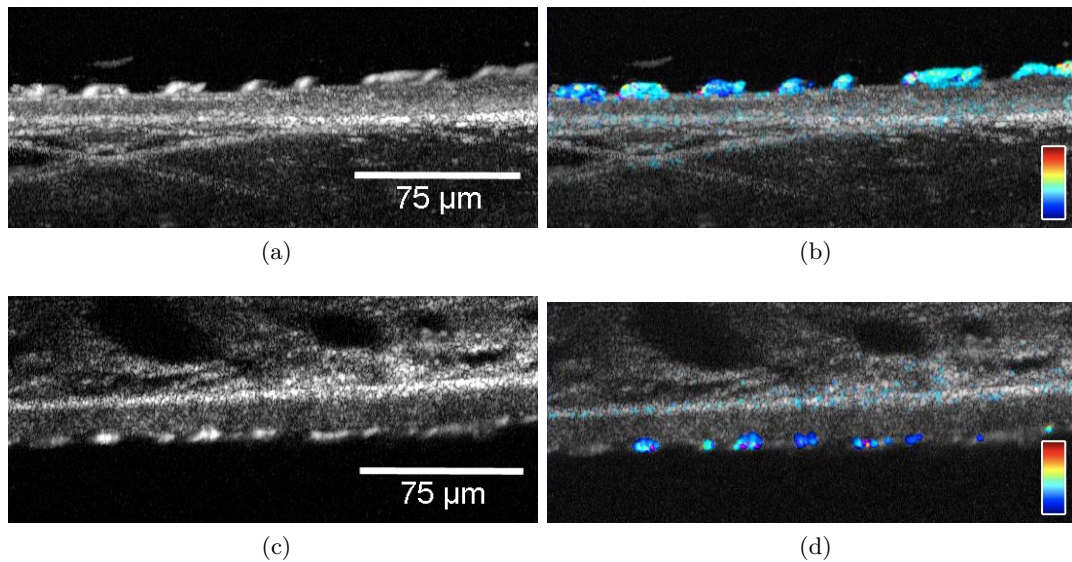


Abbildung 4.2: Messungen von Zilienbewegung an einer offenen und geschlossenen Trachea. a) Gemittelte Zeitserie über 200 B-Scans an der offenen Trachea von der Seite des Epithels gemessen. Durch die Bewegung verschwindet die Specklestruktur an den Orten der Zilienbüschel. b) Farbcodierte Darstellung der dominierenden Frequenz. c) Gemittelte Zeitserie über 200 B-Scans von Zilienbewegung durch die Wand einer geschlossenen Trachea, deren Inneres mit Flüssigkeit gefüllt war. Die Specklestruktur ist ebenfalls an den Orten der Zilienbüschel nicht mehr erkennbar. d) Farbcodierte Darstellung der dominierenden Frequenz. (Visualisierung A.1)

Sowohl bei mOCT-Bildgebung von der Innenseite (Abb. 4.2a) als auch von außen (Abb. 4.2c) ließen sich unter Verwendung des 0,5 NA Objektivs bei Mittelung über 200 B-Scans in den deutlich separierten Gruppen der Zilien ein Verwaschen der Specklestrukturen erkennen, wenn auf die Zilien tragenden Zellen fokussiert wird.

Die Bewegung der Zilien ändert von Bild zu Bild die Speckle, die letztlich durch die Interferenz der Streuer innerhalb des Fokusvolumens entstehen. Im Gegensatz zu den statischen Strukturen der Tracheawand mitteln sich die Speckle bei den Zilien zu einer gleichmäßigen Fläche. Die Fourier-Analyse der Intensitätsschwankungen der Speckle durch den Zilienschlag (Abb. 4.2b) ergibt eine dominierende Frequenz von 12 Hz. Außerhalb der einzelnen Gruppen der Zilien werden keine schnellen Signalschwankungen gemessen. Messungen der Zilienbewegungen sind auch von außen durch die geschlossene, mit Pufferlösung gefüllte Trachea möglich (Abb. 4.2c). Ziliengruppen sind auch hier gut am Verschwinden der Specklestruktur zu erkennen. Trotz geringerer Abbildungsqualität ist eine Bestimmung der Zilienschlagfrequenz möglich, wenn auch weniger deutlich als bei direkter Betrachtung vom Lumen her. Wo Ziliengruppen deutlich im gemittelten B-Scan zu erkennen sind, wurde eine Frequenz von 10 Hz bis 12 Hz gemessen (Abb. 4.2d). Die Ursache für die reduzierte Abbildungsqualität sind die Verringerung des Signal-Rausch-Abstandes und Aberrationen beim Durchgang des Lichtwellenfelds durch die Trachealwand.

Eine Quantifizierung der Zilienschlagfrequenz bei Zilien, die sich in wässriger Umgebung befinden, ist mit mOCT gut möglich. Die Zilien sind im OCT gut sichtbar und ihre Bewegung dominiert das mOCT-Signal an der Gewebeoberfläche. Dies ist keine physiologische Bildgebungssituation, da die Trachea *in vivo* mit Luft gefüllt ist. Der Brechungsindexunterschied zwischen ASL und Luft erzeugt ein starkes mOCT-Signal, welches das OCT-Signal der Zilien überstrahlt. Um die Darstellbarkeit der Bewegung von Zilien, die mit einer physiologischen, nur wenige Mikrometer dicken Flüssigkeitsschicht bedeckt sind, zu testen, wurde an einem der Enden einer rohrförmigen Trachea über eine dünne Kanüle eine Luftblase injiziert. In einem aus 100 Bildern gemittelten B-Scan ist die Grenzschicht (g) zwischen der Flüssigkeit (lq) und der Luft (ai) deutlich zu erkennen (Abb. 4.3a). Zilien können visuell nur dort über das Verschwinden der Speckle eindeutig identifiziert werden, wo die Flüssigkeit die Grenzschicht deutlich vom Epithel separiert (linke Hälfte des Gesichtsfeldes). An der Stelle, wo die Grenzfläche an das Epithel trifft (cb), kann mit bloßem Auge ein Verwaschen der Speckle nicht mehr klar visualisiert werden. Betrachtet man den A-Scan (Abb. 4.3b) an dieser Stelle, so zeigt sich aber, dass gerade noch eine Separation zwischen dem Epithel bzw. den Zilien und der Grenzschicht gegeben ist. Auch die Frequenzanalyse kann die Zilienschlagfrequenz hier noch bestimmen. Noch weiter rechts ist dies nicht mehr möglich. (Abb. 4.3c).

4.1.1.3 Beobachtung der Transportmechanismen von Mukus in der lebenden Maus

mOCT kann nicht nur *ex vivo* im Trachealgewebe morphologische Strukturen mit mikroskopischer Auflösung darstellen, sondern ist auch in der Lage, hochdynamische zelluläre Vorgänge, wie den Zilienschlag zu visualisieren und zu quantifizieren. Aufgrund der Einschränkungen der Untersuchungen auf *ex vivo* Modelle, konnte bisher ausschließlich die Rolle und der Beitrag der Zilien zum Transport untersucht werden. Bei einer Translation in lebende Organismen, in diesem Fall auf Mäuse,

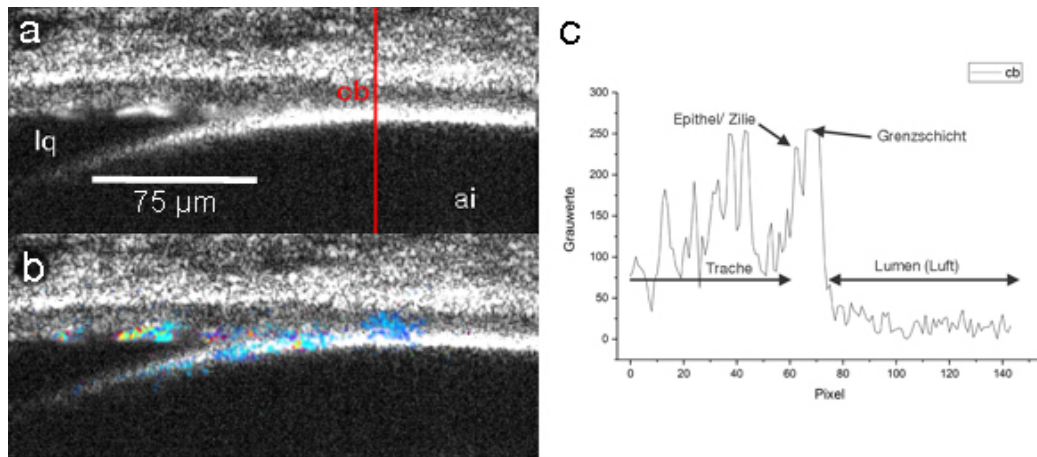


Abbildung 4.3: Gemittelter B-Scan einer Zeitserie aus 100 Bildern vom Übergang zwischen Flüssigkeit und Luftblase (a) mit zugehöriger Frequenzanalyse (b). An der Stelle, wo die Grenzfläche an das Epithel trifft (cb) zeigt sich im A-Scan (c) gerade noch eine Separation zwischen dem Epithel bzw. den Zilien und der Grenzschicht. Die Messung erfolgte durch die Trachealwand in das teilweise mit Luft gefüllte Lumen. (Visualisierung A.2)

treten neue Herausforderungen auf. Zur Generierung von aussagekräftigen Daten sollten Artefakte durch die experimentelle Prozedur so weit wie möglich vermieden werden. Hierzu sollte die spontane Atmung der Maus erhalten bleiben, was durch eine entsprechende Narkotisierung sichergestellt wurde. Ebenfalls sollte die Trachea geschlossen und frei beweglich bleiben. Bei den *ex vivo* Untersuchung war kein Mukus auf den Proben vorhanden. Im Gegensatz dazu kann *in vivo* nicht nur das Vorhandensein von Mukus sondern auch dessen Transport visualisiert werden. mOCT sollte im Rahmen einer Tierstudie zur Visualisierung des Transports von Mukus in einem CF-Mausmodell eingesetzt werden. In den Voruntersuchungen (4.1.1.1) hatte sich gezeigt, dass das 5x/0,16 Objektiv den besten Überblick liefert und sich dieses Objektiv daher besonders dann eignet, wenn die Dicke der Mukusschicht und der Transport von Mukus visualisiert werden soll. Zur Darstellung einzelner Bereiche mit einem höheren Detaillierungsgrad, wie z. B. der Zilien, wurde das 20x/0,5 Objektiv verwendet.

Abbildung 4.4a zeigt ein Übersichtsbild einer *in vivo* gemessenen Trachea, aufgenommen mit dem 5x/0,16 Objektiv (Abb. 4.4b). Es zeigt die ventrale Trachealwand über eine Länge von 5 mm und einer Tiefe von 0,5 mm. Die Visualisierung reicht über die gesamte Tiefe der Trachealwand. Das *Cartilagine tracheales* (ca) ist besonders deutlich zu erkennen. Gleichwohl sind einzelne Knorpelzellen nicht auflösbar. In dem Zwischenraum zeichnen sich Lymphgefäße ab. Ebenfalls lassen sich, bei dieser Auflösung, die *Lamina propria* (lp) und die Grenze zwischen dem Epithel (ep) und dem Lumen (lu) über die gesamte Länge visualisieren.

Betrachtet man die Trachea in einem größeren Detaillierungsgrad mit dem 20x/0,5 Objektiv (Abb.4.4c), können auch kleinere Gefäße und zelluläre Strukturen visualisiert

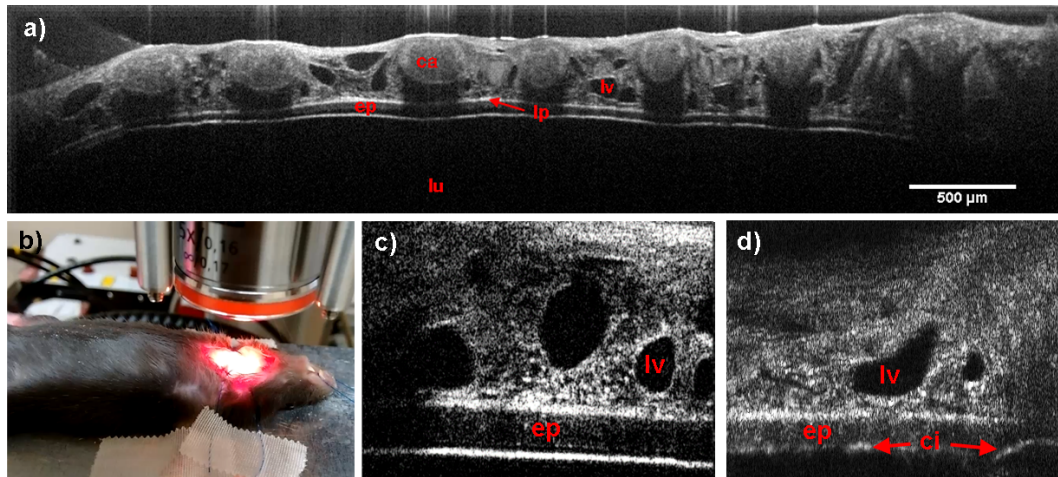


Abbildung 4.4: a) mOCT-Darstellung der oberen Trachealwand mit dem 5x/0,16 Objektiv *in vivo*. b) Messung der oberen Trachealwand mittels mOCT am lebenden Tier mit dem 20x/0,5 Objektiv. c) Trachea ist Luft gefüllt. Die Grenzfläche der ASL zum Lumen erzeugt ein starkes Reflexionssignal. d) Applikation von Kochsalzlösung verhindert Reflexion an Grenzfläche und macht die Grenze des Epithels sichtbar. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde jeweils mehrere B-Scans gemittelt.

werden. Die *Lamina propria* ist auch hier wieder deutlich sichtbar. Das Epithel ist nur schwer vom Hintergrund zu differenzieren. Hingegen ist die Grenze zwischen dem Epithel und dem Lumen durch die starke Streuung gut sichtbar. Um die starke Reflexion zu unterdrücken, wurde isotone Kochsalzlösung über die Nase in die Trachea eingebracht, was kurzzeitig die Trachea über den gesamten Querschnitt füllte (Abb. 4.4d). Dadurch entfiel die Luft-Flüssigkeits-Grenze und Zilien auf dem Epithel konnten visualisiert werden.

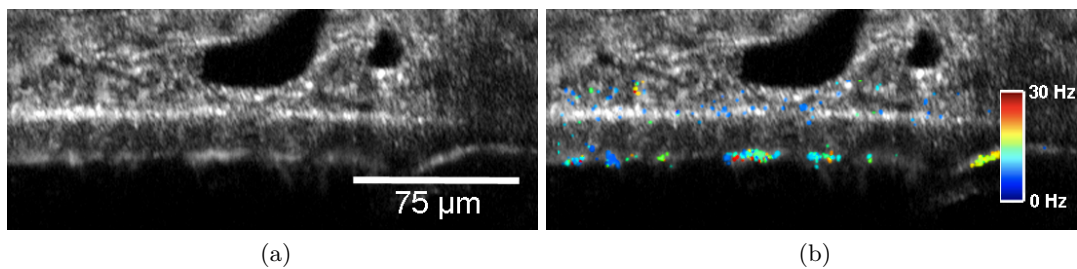


Abbildung 4.5: Messung der Zilienschlagfrequenz in der lebenden Maus nach Blockade der Atmung. Gemittelte Zeitserie über 100 B-Scans von Zilienbewegung durch die Wand einer intakten Trachea. a) Die Specklestruktur ist an den Orten der Zilienbüschel nicht mehr erkennbar. b) Farbcodierte Darstellung der dominierenden Frequenzen. (Visualisierung A.3)

Um zu demonstrieren, dass die Quantifizierung des Zilienschlages *in vivo* im Prinzip

möglich ist, wurde die Atmung der Tiere durch Applikation von Pankeronium [101] blockiert, um Bewegung zu unterdrücken. Der Einfluss des Herzschlages wurden

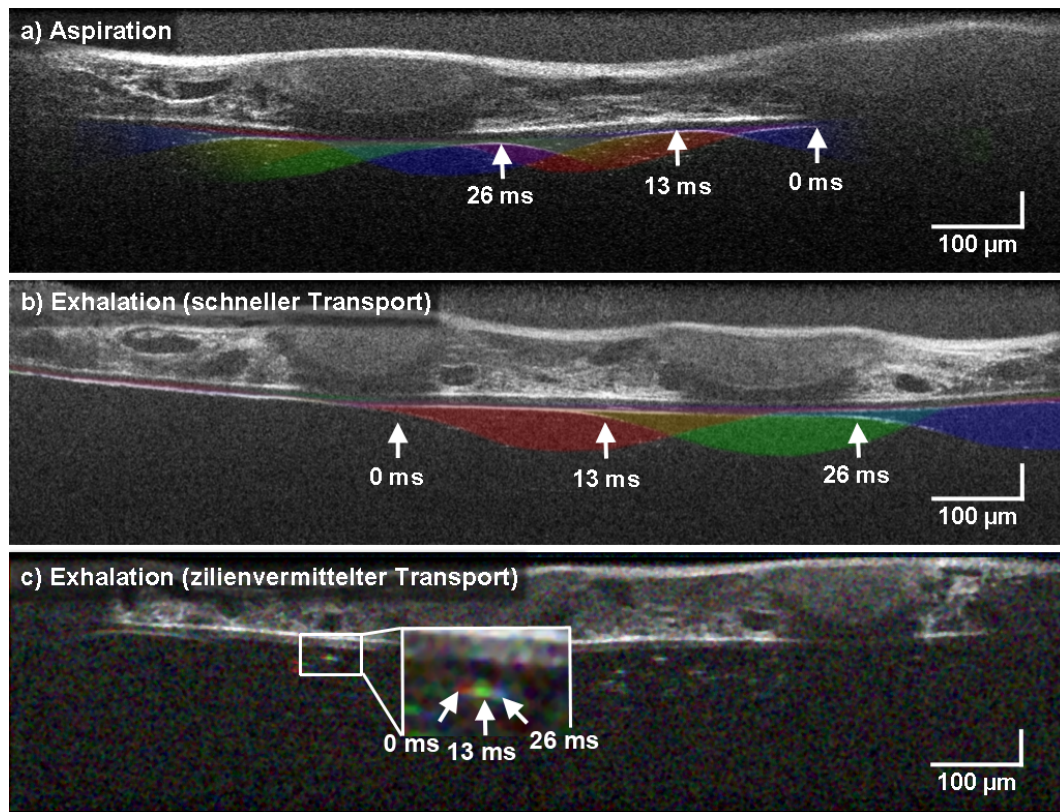


Abbildung 4.6: Überlagerte Darstellung der *in vivo* mOCT-Messung zu drei Messzeitpunkten. Es wird ein schneller Mukustransport in der Aspirationsphase (a) und der Exhalationsphase (b) beobachtet. Ein langsamerer Transport ist wahrscheinlich zilienvermittelt (c). Zur besseren Visualisierung wurde der Mucus zum Startzeitpunkt in rot, nach 13 Millisekunden in grün und nach 26 Millisekunden in blau eingefärbt.

in Zeitserien von 100 Bildern mittels rigider Registrierung [102] minimiert. Abbildung 4.5a zeigt den resultierenden, über die Zeitserie gemittelten, B-Scan. Während für Gewebe innerhalb der Trachealwand keine signifikante Frequenz gefunden werden konnte, ergibt die Analyse in der Zilienebene Frequenzen in einem Bereich zwischen 12 bis 19 Hz (Abb. 4.5b). Mit der mOCT konnten an lebenden Mäusen verschiedene Mechanismen des Mukustransports, welche auf dem Zilienschlag oder auf Luftströmung wie z. B. Atmung, Husten und ähnlichen Effekten basieren, beobachtet werden. Um die Beobachtungen quantitativ einordnen zu können, wurden diese verschiedenen Mechanismen in einer Maus exemplarisch untersucht, indem 30 µl isotonische Kochsalzlösung mit Partikeln versetzt, nasal appliziert wurde. Dabei wurde sowohl während der Aspiration als auch während der anschließenden Exhalation mit dem 20x/0,5 Objektiv Zeitserien von B-Scans aufgezeichnet.

Während der Applikation von Kochsalzlösung konnte ein schneller Transport der Flüssigkeit in *caudaler* Richtung beobachtet werden (Abb. 4.6a). Durch eine Verfol-

gung des Mukus über mehrere B-Scans wurde eine Geschwindigkeit von 17 mm/s gemessen. Nach der Inhalationsphase konnte ein *cranial* gerichteter Transport über mehrere Minuten beobachtet werden. Dabei wurde ein stoßartiger Transport in Richtung des Larynx beobachtet, welcher mit einer Geschwindigkeit von 24,00 mm/s (Abb. 4.6b) schneller war, als der Transport während der Inhalationsphase. Langsamere Transporte wurden durch die Verfolgung einzelner Partikel im Mukus bestimmt, wie exemplarisch in Abbildung 4.6c dargestellt. Dabei wurde eine Geschwindigkeit von 0,16 mm/s gemessen.

4.1.2 Studie zur Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen

In der folgenden Studie wurde mOCT genutzt, Veränderungen des Mukustransports nach Gabe von hypertoner Kochsalzlösung an β -ENaC überexprimierten Mäusen, einem Tiermodell für CF, zu untersuchen. Als Kontrollgruppe wurde eine Maus ohne genetisch veränderten Phänotyp verwendet. Die Fragestellung der Messungen war, ob die osmotische Wirkung von hypertoner Kochsalzlösung die Dicke der ASL durch zusätzliche Einlagerung von Wasser gegenüber isotoner Kochsalzlösung erhöht und ob sich die Transporteigenschaften des Mukus verändern. Damit sollte der therapeutische Effekt von isotoner bzw. hypertoner Kochsalzlösung bei CF anhand der β -ENaC überexprimierten Mäuse evaluiert werden. Wie im vorherigen Experiment (4.1.1.3) wurde den Tieren jeweils 30 μ l hypertone bzw. isotone Kochsalzlösung nasal appliziert. In der Versuchsreihe soll die direkte Veränderung der ASL und des Mukustransport evaluiert und quantifiziert werden.

Vor der Applikation der Kochsalzlösung wurden für jede Maus über einen Zeitraum von mindestens 5 min B-Scans aufgezeichnet. Weder in den Tieren der Kontrollgruppe noch bei den β -ENaC-überexprimierten Mäusen wurde Mukustransport oder irgendwelche Veränderung der Epithel-, ASL- und Mukusdicke über den Beobachtungszeitraum vor Applikation von Kochsalzlösung festgestellt. Diese Beobachtung ist auf den ersten Blick erstaunlich, da bei β -ENaC-überexprimierten Mäusen eine erhöhte Menge an Mukus in der Lunge erwartet wird. Dieser Mukus befindet sich offensichtlich nicht in der Trachea, sondern in tieferen Bereichen der Lunge, aus denen er nicht transportiert wird. Direkt während der Applikation konnte mit beiden Lösungen bei allen Mäusen eine starke Bewegung des Brustkorbes und ein schneller Transport der Flüssigkeit in Richtung der Lunge beobachtet werden, welcher innerhalb von weniger als 30 s nachließ.

Die Wirkung von 30 μ l nasal applizierter, isotoner Kochsalzlösung wurde zuerst an 5 WT Kontrolltieren untersucht. Abbildung 4.7 zeigt anhand einer repräsentativen Serie von B-Scans über einen Zeitraum von 50 Sekunden, den charakteristischen Mukustransport für eines der untersuchten WT-Tiere. Außer dem Transport der Kochsalzlösung direkt nach Applikation konnte kein Mukustransport oder eine Veränderung der ASL-Dicke beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen wurde auch an weiteren 5 WT-Kontrolltieren (Abb. 4.7, rechts) nach der Applikation von 30 μ l hypertoner Kochsalzlösung gemacht. Lediglich in der Exhalationsphase direkt

nach der Gabe der Kochsalzlösung war in einem Tier kurzzeitig Transport einer kleineren Mengen an Mukus sichtbar. Anders stellt sich die Situation in den β -ENaC überexprimierten Mäusen dar. Sowohl nach der Gabe isotoner Kochsalzlösung (Abb. 4.8, links) als auch nach der Gabe hypertoner Kochsalzlösung (Abb. 4.8, rechts) wurde eine massive Mobilisation von Mukus mittels mOCT beobachtet. Im direkten Vergleich zwischen den Tieren, welche mit isotoner bzw. hypertoner Kochsalzlösung behandelt wurden, lassen sich qualitative Unterschiede im Transport des Mukus beobachten.

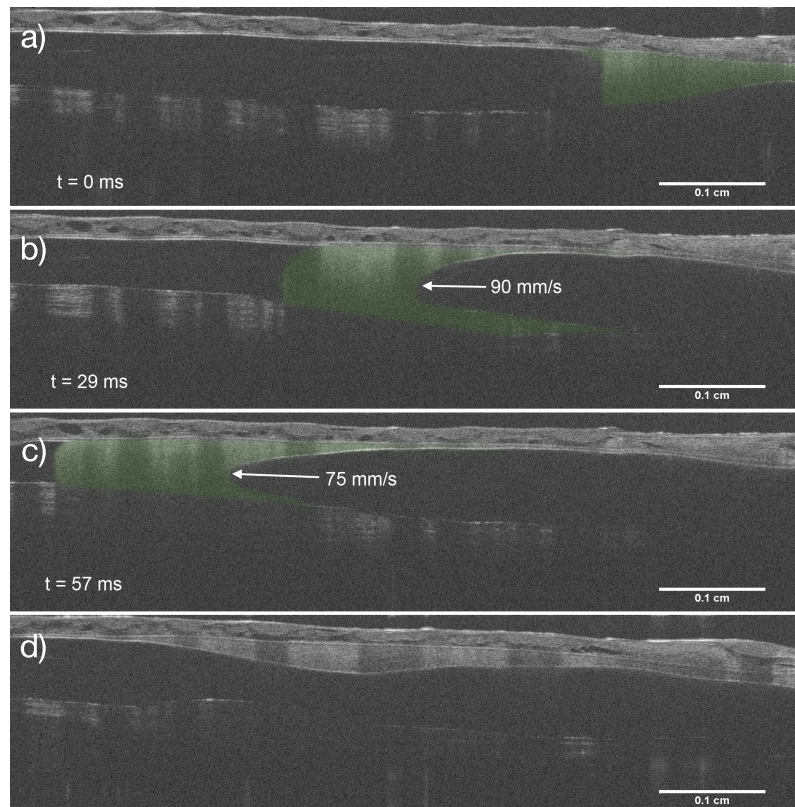


Abbildung 4.9: OCT-Aufnahme nach der Gabe von isotoner Kochsalzlösung zeigt eine Blockade über den vollen Querschnitt der Trachea durch Mukus (Bereich wurde nachträglich grün eingefärbt. (a-c) Verlauf der Blockade über einen Inspirationszyklus. (d) Nach mehreren Atemzyklen ist die Trachea wieder durchgängig. (Visualisierung A.6)

Nicht nur die mittlere Dicke, sondern auch ihre zeitliche Variation und der Transport über den Larynx unterscheiden sich. Während bei der hypertonen Kochsalzlösung eine homogene Verdickung der Mukusschicht beobachtet werden konnte, führte isotoner Kochsalzlösung sichtbar zu einer vermehrten Ansammlung von Mukus vor dem Larynx, die zeitweise die Trachea vollständig blockierte. Dies wurde mit OCT-Messungen bei 1300 nm mit 2,5 mm Messtiefe bei 7 μ m axialer Auflösung verifiziert. Abbildung 4.9 zeigt exemplarisch einen mit OCT visualisierten Inspirationszyklus, bei dem die Trachea durch den Mukus komplett geblockt wurde und ein Austausch von Luft in der Lunge nicht mehr möglich war. Während der Blockade wurde der

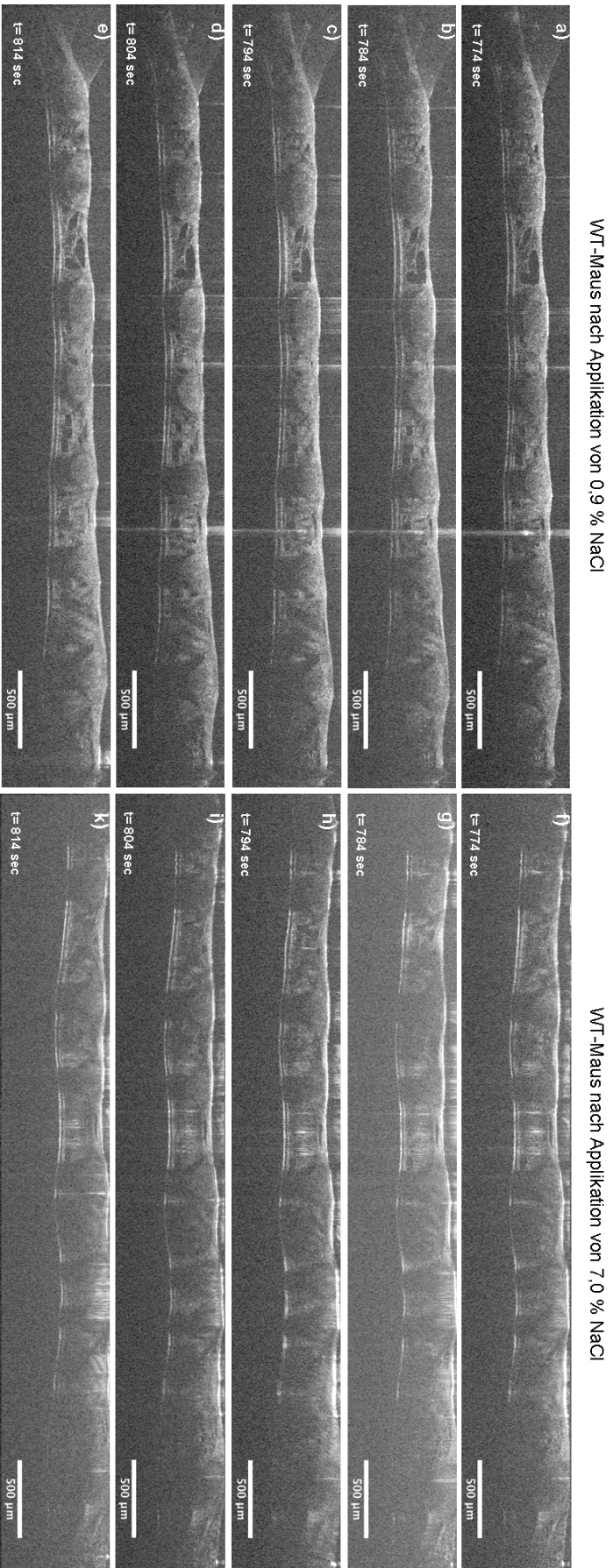


Abbildung 4.7: Repräsentative Serie von B-Scans über einen Zeitraum von 50 Sekunden, die den charakteristischen Mukustransport anhand je eines der untersuchten WT-Tiere nach Gabe von isotoner Kochsalzlösung (a-e) bzw. hypertoner Kochsalzlösung (f-j) zeigt. Die Mukusschicht wurde zur besseren Visualisierung grün eingefärbt. (Visualisierung A.4)

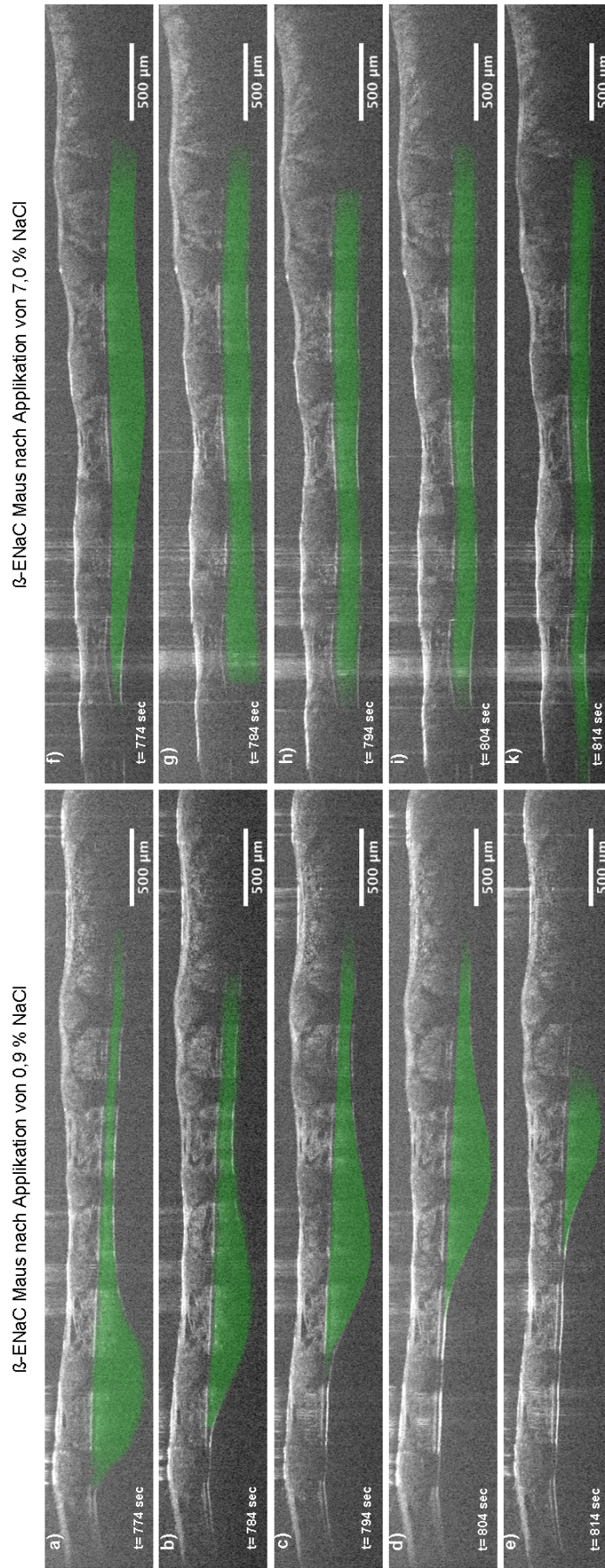


Abbildung 4.8: Repräsentative Serie von B-Scans über einen Zeitraum von 50 Sekunden, die den charakteristischen Mukutransport anhand je eines der untersuchte β -ENaC-Tiere nach der Applikation von isotoner Kochsalzlösung (a-e) bzw. hypertoner Kochsalzlösung (f-j) zeigt. Die Mukusschicht wurde zur besseren Visualisierung grün eingefärbt. (Visualisierung A.5)

Mucus durch die Atmung des Tieres mit sehr hohen Geschwindigkeiten von bis zu 90 mm/s vor und zurückbewegt. Häufig führten die schnellen Atembewegungen wieder zu einer Öffnung der Blockade (Abb. 4.9.d) und der Luftaustausch wurde wieder ermöglicht.

Um verlässliche und reproduzierbare Aussagen über Mukustransport und Hydratisierung zu bekommen, wurden quantitative Parameter durch Analyse der Bildserien bestimmt. In jedem B-Scan wurden vier Bereiche mit guter Darstellung von Epithel, Flüssigkeitsschicht und Mucus ausgewählt, welche alle jeweils zwischen den Knorpelspangen lagen (4.10a).

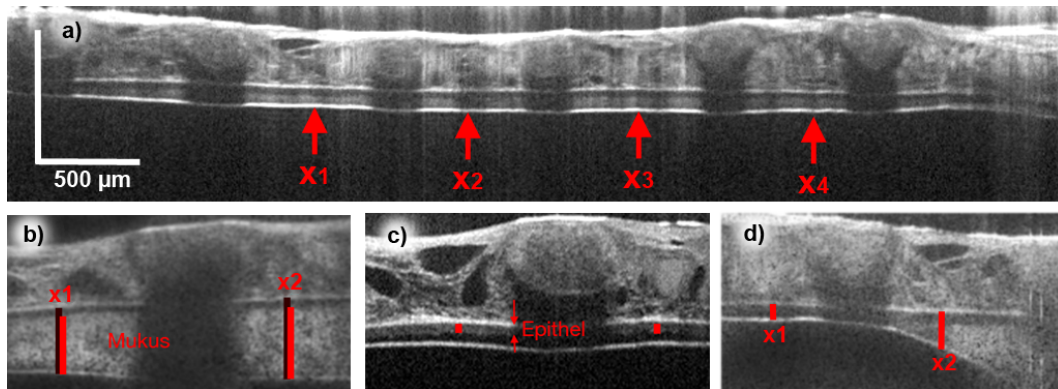


Abbildung 4.10: a) Definition der Auswertegeometrie mit der exemplarischen Darstellung der vier Messpunkte. Die Veränderung der ASL-Dicke wurde durch das Messen des Abstandes zwischen der *Lamina propria* bis zu der hochreflektierenden Grenze zwischen dem Mucus und dem Lumen (b). Die Epitheldicke wurde als Strecke zwischen der hochreflektiven *Lamina propria* und den Zilien bzw. dem Beginn der Zilien gemessen (c). Die Inhomogenität in der Dicke der Mukusschicht wurde quantifiziert, indem für jeden Messzeitpunkt an vier Stellen die ASL-Dicke bestimmt, auf die jeweils höchste normiert und die Varianz gebildet wurde.

Ein wichtiger Indikator für Mukustransport stellt dabei die Dicke der ASL dar, welche die Höhe des Flüssigkeitsfilms ausgehend vom Epithel beschreibt. Da eine direkte Messung gerade bei sehr geringen Dicken des ALS sehr unsicher ist, wurde von der hochreflektierenden *Lamina propria* bis zu der hochreflektierenden Grenze zwischen dem Mucus und dem Lumen gemessen (Abb. 4.10b). Dabei wurde für jeden Zeitpunkt, an den vier definierten Messstellen, ein Mittelwert gebildet

$$\bar{x} = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^4 x_i. \quad (4.1)$$

Eine indirekte Bestimmung der ASL war möglich, indem die vorher gemessene Epitheldicke abgezogen (Abb. 4.10c) wurde. Die Epitheldicke wurde als Strecke zwischen der hochreflektiven *Lamina propria* und den Zilien bzw. dem Beginn der Zilien gemessen. Bei den β -ENaC Mäusen betrug die Epithelhöhe 25,1 µm

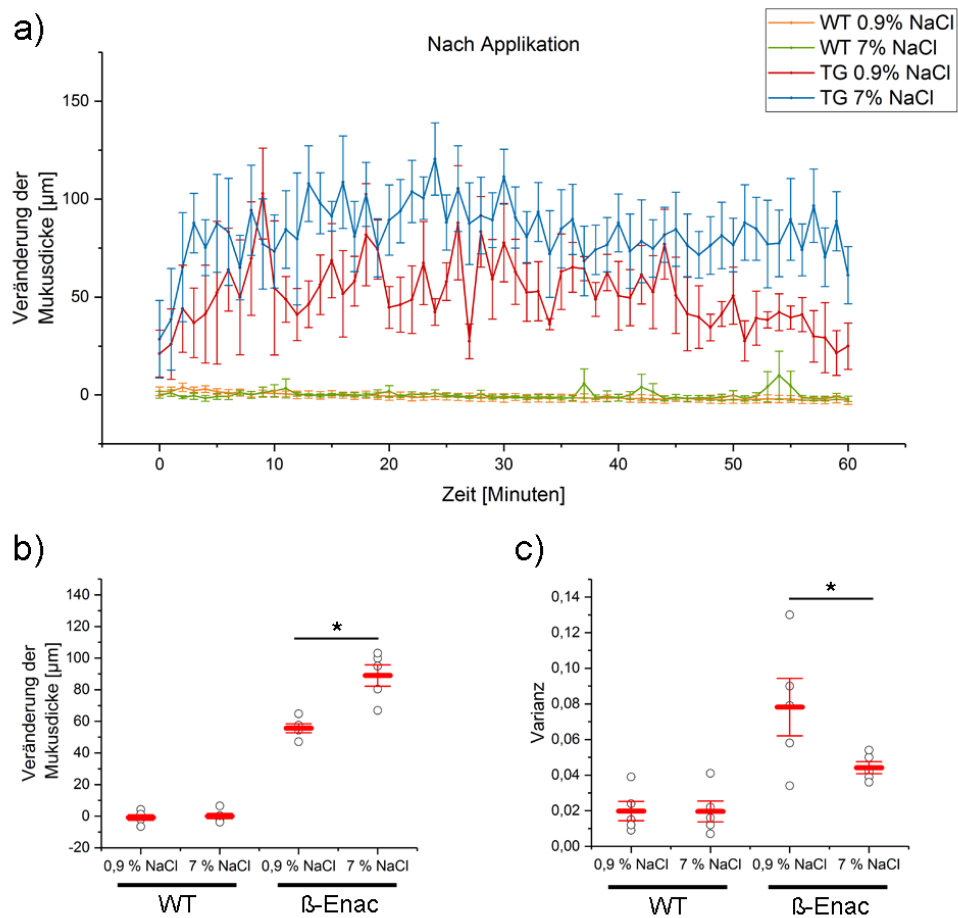


Abbildung 4.11: a) Quantitativer Vergleich der zeitlichen Veränderung der ASL-Dicke nach Anwendung von isotoner und hypertoner Kochsalzlösung in WT- und β ENaC-Mäusen. Durchschnittliche Veränderung der mittleren ASL-Dicke (b) und der mittleren Varianz der ASL-Dicke (c) über den Beobachtungszeitraum dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die statistische Auswertung wurde mit dem einseitigen Mann-Whitney U-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$.

(SEM \pm 1,3 μ m). Sie konnte aufgrund des durch die Kochsalzlösung freigesetzten Mukus einfach bestimmt werden. Vor der Applikation konnte sowohl in den WT-Kontrolltieren als auch in den β -ENaC Mäusen nur eine sehr kleine ASL beobachtet werden. In β -ENaC Mäuse betrug diese im Mittel 2,4 μ m (SEM \pm 1,3 μ m), was in einem guten Einklang mit Literaturwerten steht [98].

Nach der Gabe der isotonen Kochsalzlösung (Abb. 4.11a, orange) konnte in den 5 WT-Kontrolltieren eine Zunahme der Mukusdicke auf bis zu 5 μ m innerhalb der ersten 5 min beobachtet werden. Danach verringerte sich die Mukusdicke wieder über die nächsten 50 min. Im Gesamtverlauf konnte eine durchschnittliche Abnahme der Mukusdicke von 0,8 μ m (Abb. 4.11b) gemessen werden. Abgesehen von initialen Effekten direkt nach Applikation der Kochsalzlösungen, war also keine dauerhafte Änderung der Dicke der ASL zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse brachte die Analyse

der ASL-Dicke nach Applikation von hypertoner Kochsalzlösung (Abb. 4.11a, grün) an weiteren 5 WT-Kontrolltieren. So ließ sich eine Abnahme der Mukusdicke von bis zu 2,5 μm innerhalb der ersten Minute feststellen, die nach weiteren 10 min auf das Ursprungsniveau zurückkehrte. Im Gesamtverlauf konnte mit im Mittel 0,1 μm (Abb. 4.11b) keine signifikante Zunahme der Mukusdicke gegenüber dem Ausgangsniveau beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die nasale Applikation von 30 μl isotoner Kochsalzlösung bzw. hypertoner Kochsalzlösung in den WT-Kontrolltieren lediglich zu geringen Änderungen von ASL- und Epitheldicken führten.

Bei den β -ENaC Mäusen kam es hingegen innerhalb von weniger als 5 min zu einem signifikanten Anstieg von ASL- und Mukusdicke (Abb. 4.11a, rot und blau), der über den Beobachtungszeitraum von 60 min im Mittel ca. 55,6 μm (Abb. 4.11b) bei Gabe von isotoner Kochsalzlösung und 89,0 μm (Abb. 4.11b) bei der Gabe von hypertoner Kochsalzlösung betrug. Durch das Verfolgen von Partikeln, die die in aufeinander folgenden B-Scans auftauchen, konnte eine durchschnittliche Transportgeschwindigkeit gemessen werden, welche mit 76 $\mu\text{m}/\text{s}$ nach Applikation von isotoner und 90 $\mu\text{m}/\text{s}$ nach Applikation von hypertoner Kochsalzlösung in einer ähnlichen Größenordnung lag und zu vorher beobachteten Geschwindigkeiten von zilienvermitteltem Transport passte. Zusätzlich zum Unterschied in der Dicke nach Gabe von isotoner und hypertoner Kochsalzlösung konnte auch eine Inhomogenität in der Dicke der Mukusschicht beobachtet werden. Um dies quantitativ abbilden zu können, wurde ein Homogenitätskoeffizient definiert. Hierfür wurde für jeden Messzeitpunkt an vier Stellen die ASL-Dicke bestimmt und auf die jeweils höchste normiert (Abb. 4.10d). Der Homogenitätsfaktor ist die Varianz

$$h = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^4 (x_i - \bar{x})^2 \quad (4.2)$$

der normierten ASL-Dicke x_i . Der Mittelwert der normierten ASL-Dicke ist hier mit \bar{x} bezeichnet. Eine hohe Varianz entsteht entweder durch unregelmäßigen Transport oder durch eine Akkumulation von Mukus vor dem Kehlkopf. Eine gleichmäßig über die Epitheloberfläche verteilte Mukusschicht zeigt homogenen Transport und eine geringere Tendenz zur Blockade der Atemwege. In den Kontrolltieren wurde erwartungsgemäß eine geringe, mittlere Varianz von $\sigma_{WT0,9\%} = 0,02$ bzw. $\sigma_{WG7\%} = 0,02$ nach Gabe von isotoner bzw. hypertoner Kochsalzlösung ermittelt. In den β -ENaC-Tieren wurde nach Applikation der isotoner Kochsalzlösung (Abb. 4.10c) im Mittel eine Varianz von $\sigma_{TG0,9\%} = 0,079$ gemessen, wohingegen die mittlere Varianz mit $\sigma_{TG7\%} = 0,046$ nach Applikation von hypertoner Kochsalzlösung deutlich geringer war (Abb. 4.10c). Die unterschiedliche Kochsalz-Konzentration in der applizierten Flüssigkeit hat offensichtlich einen Einfluss auf die Transportfähigkeit. Die höhere Salzkonzentration führt zu einer gleichmäßigeren Verteilung des Mukus in der Trachea.

4.2 Endomikroskopische OCT (emOCT)

Dieser Abschnitt basiert auf einer Publikation in der Zeitschrift *Biomedical Optics Express* mit dem Titel „Novel endoscope with increased depth of field for imaging human nasal tissue by microscopic optical coherence tomography“. Veröffentlicht im Februar 2018 [103]. Abbildungen wurden teilweise übernommen.

4.2.1 Einfluss der Aberrationen auf die Bildentstehung der emOCT

mOCT ermöglicht im Tiermodell, ohne Eingriff in die Trachea, den Transport von Mukus bildgebend darzustellen und zu quantifizieren. Für eine Translation in den Menschen sind Endoskope notwendig, welche eine hohe laterale Auflösung mit einem großen Tiefenmessbereich kombinieren. Um dies zu erreichen, wurden sphärische und chromatische Aberrationen genutzt. Die Wirkung dieser Aberrationen auf die Bildgebung wurden durch wellenoptische Berechnungen simuliert.

4.2.1.1 Aberrationen, laterale und axiale Auflösung

Aufgrund ihres Herstellungsprozesses treten bei GRIN-Linsen sphärische, astigmatische und chromatische Aberrationen auf. Zur Simulation der mOCT-Bildgebung wurden diese Aberrationen zusätzlich zur lateralen und axialen Auflösung mit einem Wellenfrontsensor beziehungsweise über eine Messung an einem Spiegel (Kap. 3.6.3) bestimmt. Die Messung monochromatischer Aberrationen des Systems bei 750 nm mit dem Wellenfrontsensor zeigte primär sphärische Aberrationen, gemessen mit einem Wellenfrontfehler des 3,8-fachen der Zentralwellenlänge (Abb. 4.12a). Mittels

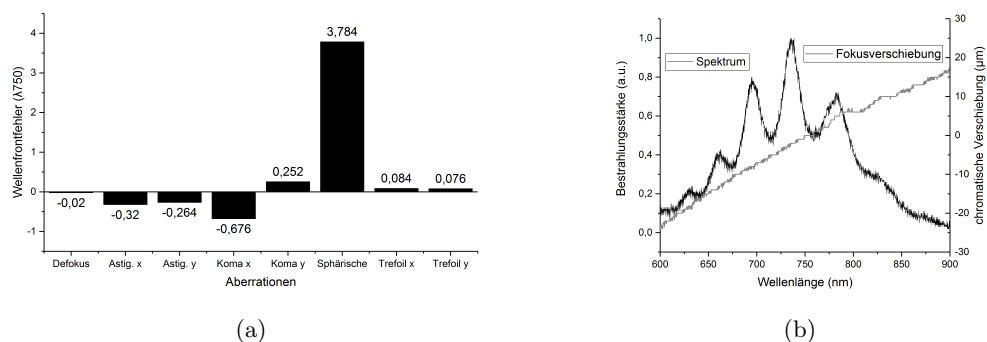


Abbildung 4.12: (a) Gemessene Wellenfrontfehler der monochromatischen Aberrationen. Die Messung erfolgte mit einem Hartmann-Shack Wellenfrontsensor bei einer Wellenlänge von 750 nm. (b) Fokusverschiebung (grau) durch chromatische Aberration. Zum Vergleich wurde die spektrale Leistungsdichte der Lichtquelle (schwarz) mit eingezeichnet.

Nanopartikeln wurde die laterale Auflösung in Abhängigkeit der Tiefe gemessen (Abb. 4.13). In der Fokusebene werden 1,15 μm erreicht. Dies entspricht nicht ganz

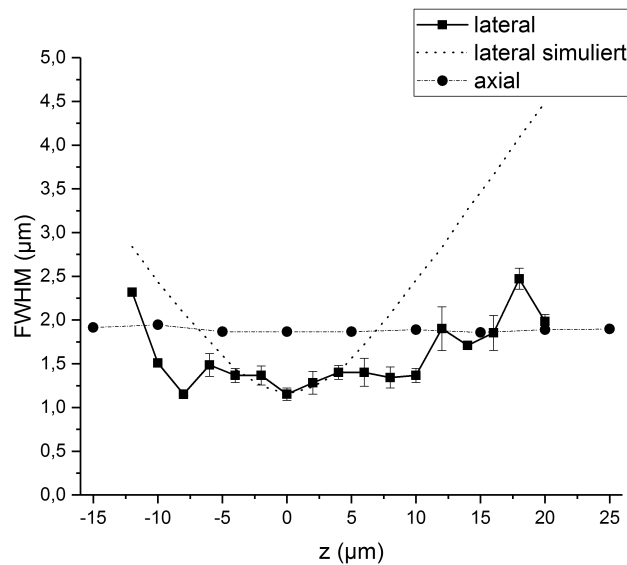


Abbildung 4.13: Gegenüberstellung der gemessenen Spotgröße (schwarz) um den Fokus mit der erwarteten Spotgröße für einen Gaußschen Strahl gleichen Fokusbereichs (gestrichelte Linie).

der Auflösung von $1,1 \mu\text{m}$, die für eine aberrationsfreie Optik der NA 0,24 erwartet wird. Dafür verschlechterte sich die Auflösung außerhalb der Fokusebene langsamer als für einen aberrationsfreien gaußschen Strahl (gestrichelte Linie). Die Auflösung war über einen Bereich von $35 \mu\text{m}$ besser als $2,00 \mu\text{m}$. Für einen aberrationsfreien Gaußstrahl mit gleichem Fokusbereich beträgt dieser Bereich nur $15 \mu\text{m}$ (Abb. 4.13). Ursache für die um das 2,3-fache verlängerte Fokustiefe sind die in Abbildung 4.12 dargestellten sphärischen und chromatischen Aberrationen. Durch die sphärischen Aberrationen werden die Strahlen im Randbereich der Optik stärker gebrochen als die achsennahen Strahlen und der Fokus in die Länge gezogen. Chromatische Aberrationen erzeugen in Abhängigkeit der Wellenlänge den Fokus in unterschiedlichen Tiefen. Für das Endoskop wurde eine chromatische Fokusverschiebung von etwa $0,14 \mu\text{m}$ pro nm Wellenlänge gemessen (Abb. 4.12b), die den Fokus über das gesamte Spektrum um mehr als $40 \mu\text{m}$ in der Tiefe verschiebt. Dieses übersteigt das konfokale Gating des äquivalenten Gaußstrahls gleichen Fokusbereichs um das 2,5-fache. Dadurch reduziert sich die effektive Spektralbreite, die für die OCT-Bildgebung verwendet werden kann, und damit auch die axiale Auflösung auf $1,8 \mu\text{m}$. Mit einem dispersionsausgeglichenen Michelson-Interferometer konnten mit Lichtquelle und Spektrometer $1,3 \mu\text{m}$ gemessen werden. Die durch die chromatische Längsaberration des Endoskops erzeugte spektrale Dämpfung des Spektrums verringert die axiale Auflösung unabhängig von der Messtiefe um ca. 25 %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Verlängerung der Fokustiefe um das 2,3-fache auf Kosten der axialen und lateralen Auflösung erreicht werden konnte.

4.2.1.2 Einfluss der Aberrationen auf die Bildentstehung in der OCT

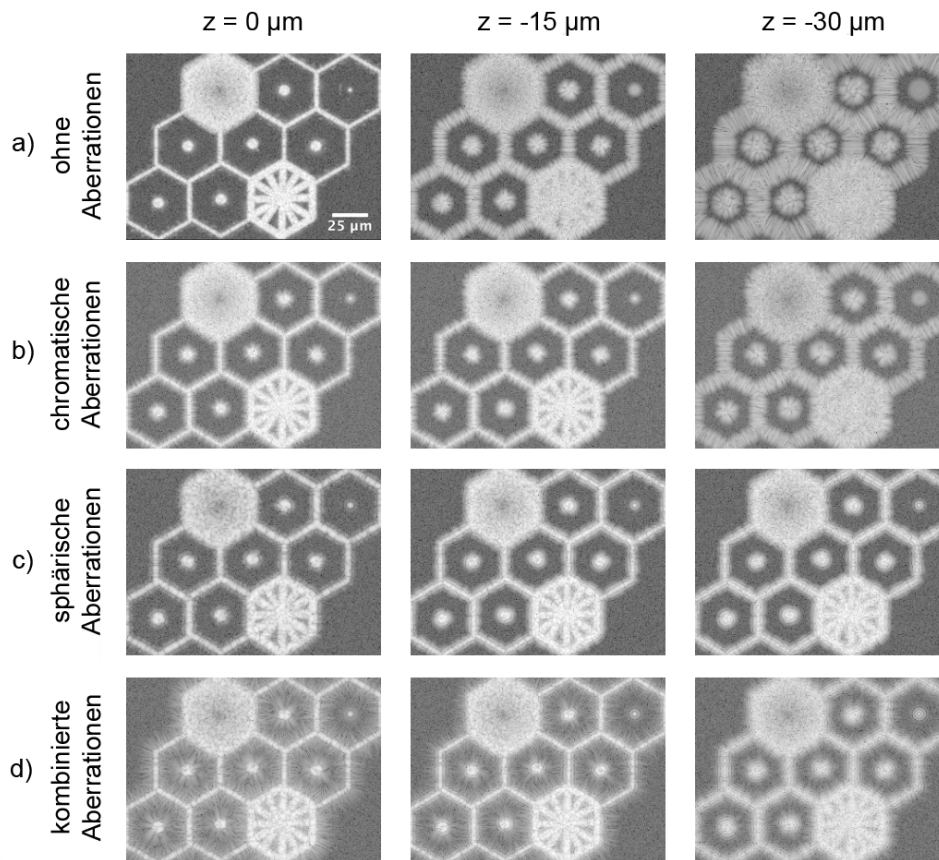


Abbildung 4.14: Simulation der mOCT-Bildgebung ohne Aberrationen (a), mit chromatischen Aberrationen (b), mit sphärischen Aberrationen (c) und mit der Kombination beider Aberrationen (d). Die simulierten Aberrationen entsprechen den für das Endoskop gemessenen Aberrationen.

Der Einfluss von Aberrationen auf die Bildqualität unterscheidet sich wegen des kohärenten Charakters der OCT-Bildgebung von dem bei inkohärenter Bildgebung, bei der im Wesentlichen eine Verringerung des Kontrastes beobachtet wird. Um die Wirkung der Aberrationen bei der emOCT besser zu verstehen, wurde die Bildgebung mit einer zellartigen Struktur (siehe Abb. 4.14a) simuliert. Die Bildgebung mit einem sphärischen Wellenfrontfehler von $3,8 \mu\text{m}$ und einer chromatischen Längsaberration von $0,14 \mu\text{m}/\text{nm}$, welche jeweils für das Endoskop gemessen wurden, wurde für verschiedene Tiefenebenen zuerst jeweils alleine und dann in ihrer Gesamtheit simuliert und mit einem idealen, aberrationsfreien System verglichen. Die Ergebnisse der Simulation sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Die erste Zeile (Abb. 4.14a) zeigt das simulierte OCT-Bild des aberrationsfreien Systems, wenn das Objekt in verschiedenen Abständen ($0 \mu\text{m}$, $-15 \mu\text{m}$ und $-30 \mu\text{m}$) von der Fokusebene positioniert ist. Den Erwartungen entsprechend verringern sowohl die chromatischen Längsaberrationen (Abb. 4.14b) als auch die sphärischen Aberrationen (Abb. 4.14c) die Bildqualität im

Fokus leicht. Es sind neben den hellen Strukturen, die Zellwände, Zellkerne und Organellen simulieren sollen, kohärente Abbildungsartefakte zu erkennen. Die homogen weiße Fläche zeigt leichte speckleartige Intensitätsmodulationen. Die Kombination beider Aberrationen verstärkt diese Effekte (Abb. 4.14d). Außerhalb der Fokusebene wird die Bildqualität vor allem durch den Defokus beeinflusst. Bei der Simulation der aberrationsfreien Abbildung ist 15 μm unterhalb der Fokusebene die Auflösung deutlich schlechter als bei den aberrationsbehafteten Bildern. Sphärische und chromatische Aberrationen ergeben einen vergleichbaren Bildeindruck. In der Kombination beider wirkt das Bild schärfer, zeigt aber auch mehr kohärente Artefakte. Die Effekte sind 30 μm unterhalb der Fokusebene noch ausgeprägter. Hier werden auch Unterschiede in der Bildqualität zwischen chromatischen und sphärischen Aberrationen sichtbar. Die beste Bildqualität, d. h. größte Verlängerung der Tiefenschärfe, wird hier mit sphärischen Aberrationen erreicht. Die Speichen können selbst noch in 30 μm Entfernung vom Fokus aufgelöst werden. Die Kombination von beiden Aberrationen, wie sie im Endoskop vorhanden sind, erzielt eine leicht schlechtere Qualität als eine Abbildung mit rein sphärischen Aberrationen. Die im Endoskop vorhandenen, chromatische und sphärische Aberrationen sind für die beobachtete Vergrößerung der effektiven Fokusslänge verantwortlich.

4.2.2 emOCT in der humanen Nase

Mit einer hohen Messgeschwindigkeit von bis zu 150 B-Scans pro Sekunde und einer räumlichen Auflösung von wenigen Mikrometern ist die emOCT in der Lage relevante morphologische Strukturen in der menschlichen Nase darzustellen und den Transport von Mukus zu quantifizieren.

4.2.2.1 Ex vivo Messung an der humanen Concha nasalis

Zur Untersuchung, welche Strukturen mit emOCT darstellbar sind, wurde humanes Gewebe der *Concha nasalis media*, das bei Operationen an der Nasenschleimhaut entfernt wurde, mit dem emOCT vermessen. Dazu wurde das Gewebe in einer mit Hepes-puffer gefüllten Petrischale fixiert und unter dem Endoskop platziert (Abb. 4.15a). Zur Reduzierung der Speckle und Verbesserung der Erkennbarkeit kleiner Strukturen wurden mehrere B-Scans inkohärent gemittelt. Der Vergleich mit dem histologischen Schnitt (Abb. 4.15b) zeigt, dass die emOCT relevante morphologischen Strukturen mit einer sehr hohen Detailgenauigkeit abbilden kann. So sind in Abbildung 4.15c relevante morphologische Strukturen wie die Zilien (ci), deren Speckle aufgrund der Bewegung der Zilien verschwinden, das Epithel (ep) und die Grenzschicht zur *Lamina propria* deutlich zu erkennen. Ebenfalls können Drüsen (gl) (Abb. 4.15d) in einer hohen Qualität dargestellt werden. In tiefer liegenden Schichten sind Gefäße (bv) (Abb. 4.15e) deutlich sichtbar.

Abbildung 4.15f zeigt eine Zeitserie von Volumenaufnahmen des Zilien tragenden Epithels, die mit einer Geschwindigkeit von zwei Volumen pro Sekunde aufgenommen wurde. Die Bewegung der Zilien ist in diesen Aufnahmen deutlich zu erkennen.

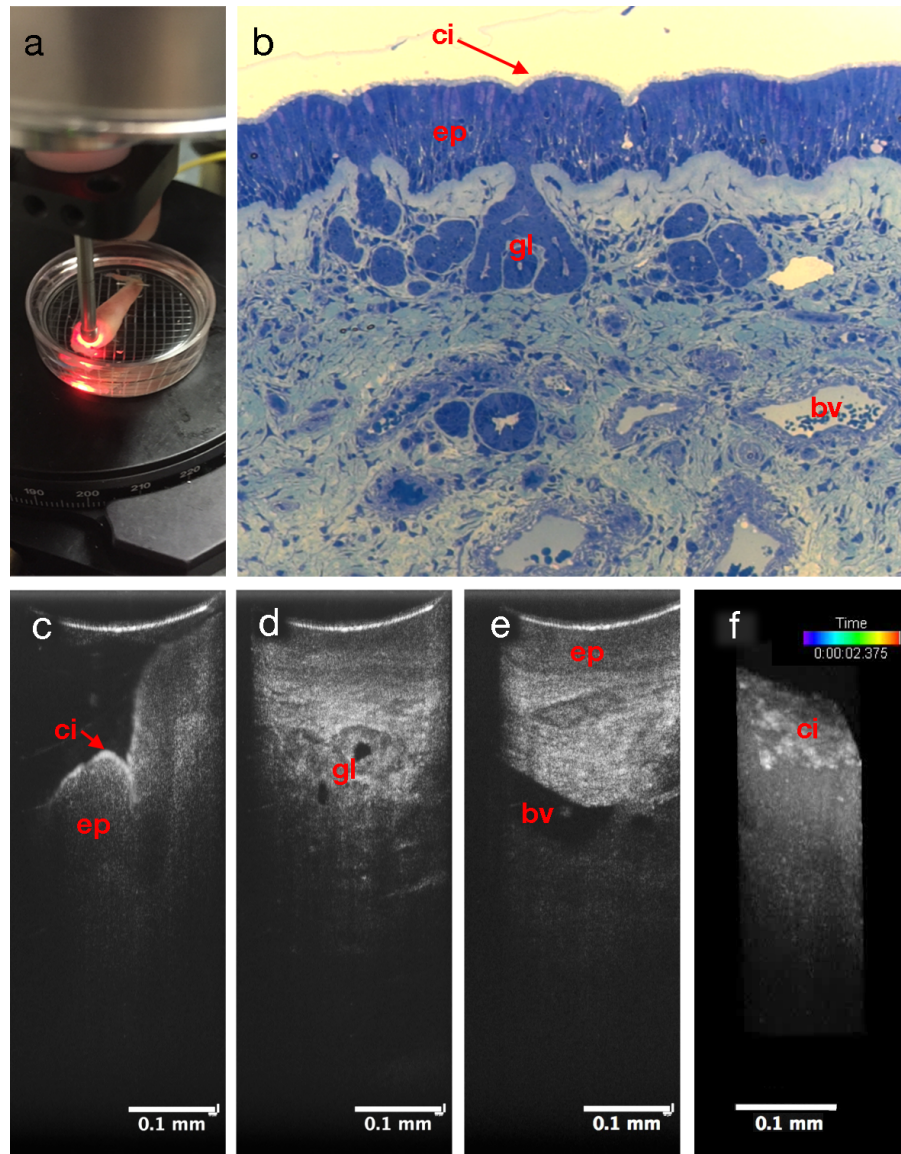


Abbildung 4.15: Ex vivo Messung an Gewebe der *Concha nasalis media*. a) Messgeometrie. b) Repräsentativer Methylenblau-Azur II gefärbter, histologischer Schnitt. c-e) emOCT-Aufnahmen des Gewebes. Relevante Strukturen wie (ci) Cilien, (ep) Epithel der Nasenmuschel, (gl) Drüsen in der subepithelialen Schicht, (d) Gefäße in der subepithelialen Schicht sind deutlich zu erkennen. Die helle Linie am oberen Bildrand ist das Endfenster des Endoskops. f) Volumenaufnahmen des Zilien tragenden Epithels, die mit einer Geschwindigkeit von zwei Volumen pro Sekunde. (Visualisierung A.7)

4.2.2.2 In vivo Messungen an der humanen Nase

Mit dem Endoskop wurden an einem Probanden Messungen im Nasenvorhof und an der *Concha nasalis* durchgeführt. Hierfür wurde der Proband freisitzend platziert und das Endoskop per Hand, ohne weitere stabilisierende Maßnahmen, in die Nase eingeführt (Abb. 4.17a). Zum Vergleich wurden Messungen mit einem OCT-System, das bei 1300 nm Arbeitswellenlänge Auflösungen von 7,5 μm axial und 15 μm lateral besitzt und damit vergleichbar mit den Spezifikationen kommerziell erhältlicher OCT-Systemen ist, im Nasenvorhof durchgeführt. Im direkten Vergleich mit konventioneller OCT zeigt sich, dass mit emOCT *in vivo* Strukturen sichtbar werden, welche mit konventioneller OCT nicht visualisierbar sind (Abb. 4.16). In einem Bildfeld von 200 μm wird mit der emOCT eine um den Faktor 5 (axial) bzw. 10 (lateral) höhere Auflösung als mit der klassischen OCT erreicht. Bei Mittelung von mehreren B-Scans ermöglicht dies die Visualisierung von einzelnen Epithelzellen und Gefäßen.

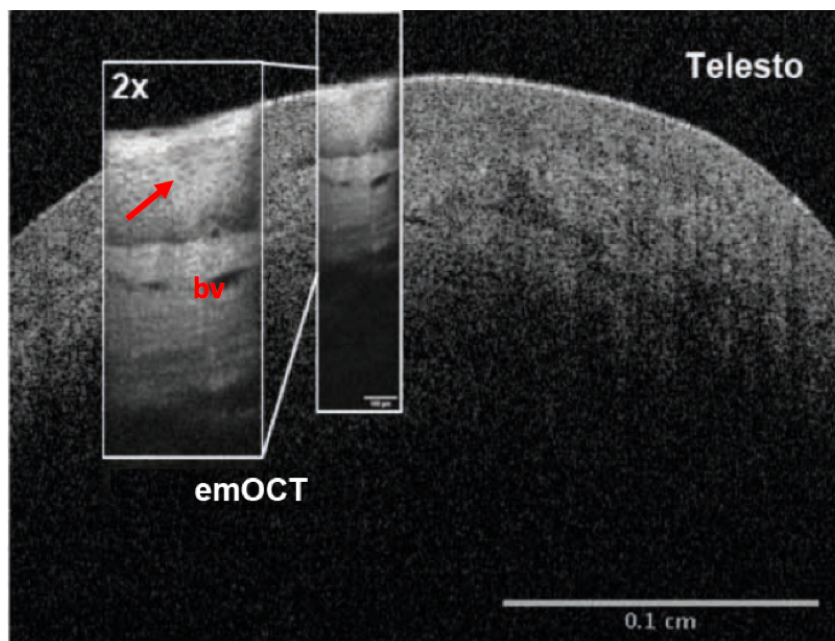


Abbildung 4.16: Vergleich der *in vivo* Darstellung von Nasengewebe aufgenommen mit einem OCT mit einer Auflösung von 10 μm zu dem emOCT, das eine 10x höheren Auflösung besitzt. Beide Bilder sind in der Darstellung gleich skaliert. Die emOCT visualisiert mit einem hohen Detaillierungsgrad die Gefäße (bv) und die einzelnen Zellen (roter Pfeil).

4.2.2.3 Morphologische Darstellung der Nasenschleimhaut

Während der Nasenvorhof mit mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel ausgekleidet ist, welches keine Ähnlichkeit zu dem respiratorischen Epithel aufweist, ist der Bereich der *Concha nasalis* mit Zilien tragendem Epithel ausgekleidet. mOCT-Messungen konnten mit dem Endoskop frontal von der *Concha nasalis media* durch-

geführt werden. Hier zeigten sich auch *in vivo* die zellulären Strukturen des Epithels (Abb. 4.17). Sowohl Zilien als auch die Grenze zwischen Epithel und *Lamina propria* sowie Drüsen und Blutgefäße waren visualisierbar. Trotz der Fokusverlängerung durch die Aberrationen ist der Tiefenbereich von 20 - 30 μm , in dem eine laterale Auflösung von 2 μm oder besser erreicht wird, deutlich geringer als der Tiefenbereich, der zur Darstellung des Epithels benötigt wird. Deshalb hängt die Darstellbarkeit feiner Strukturen von der Position des Fokus ab, die manuell eingestellt werden muss.

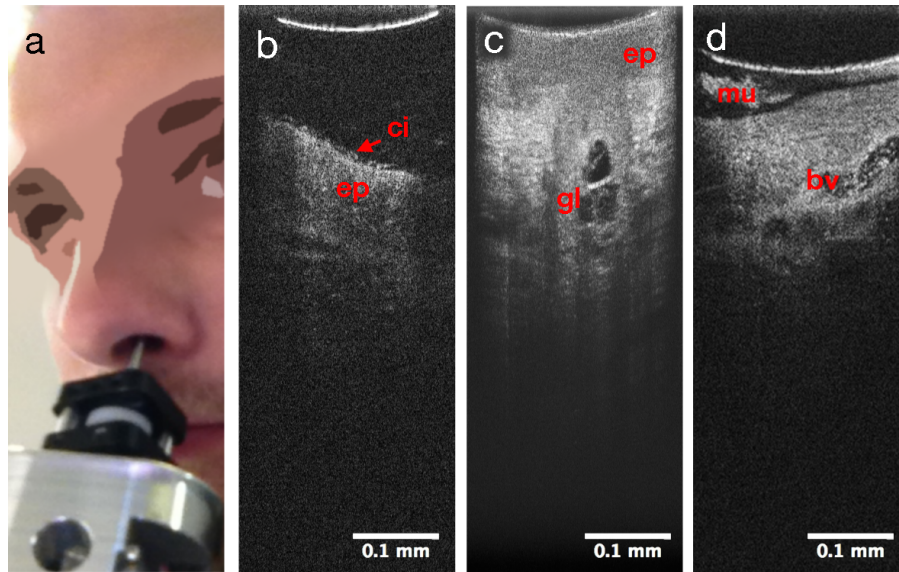


Abbildung 4.17: a) emOCT Messung in der Nase eines Probanden. b-c) In den *in vivo* emOCT-Aufnahmen der *Concha nasalis*. Relevante Strukturen wie (ci) Zilien, (ep) Epithel der Nasenmuschel, (gl) Drüsen in der subepithelialen Schicht, (d) Gefäße in der subepithelialen Schicht und (mu) Schleim sind deutlich zu erkennen. Die helle gekrümmte Linie am oberen Bildrand ist das Endfenster des Endoskops. (Visualisierung A.8)

Mit einer B-Scan-Rate von bis zu 150 Hz konnten mit der emOCT dynamische Vorgänge, wie z. B. der Fluss einzelner Blutzellen innerhalb der Gefäße oder Mukustransport (Abb. 4.16d), sichtbar gemacht werden. Die mechanische Irritation durch das Endoskop regt die Schleimdrüsen zur Mukusproduktion an, sodass größere Mukusmengen in der Regel über dem Epithel sichtbar sind. Auch wenn die Zilien in einer guten Qualität visualisiert werden konnten (Abb. 4.16b), war eine quantitative Analyse der Zilienschlagfrequenz nicht möglich. Da das Endoskop ohne Stabilisierungen in die Nase eingeführt wurde, konnten die Zilien nicht über den für die Analyse benötigten Zeitraum von mehreren hundert Millisekunden im Bildfeld gehalten werden. Während axiale und laterale Bewegungen entlang der Scanrichtung durch Registrierung ausgeglichen werden können, ist dies für laterale Bewegung orthogonal zur Scanrichtung nicht möglich, da mit der notwendigen Geschwindigkeit nur B-Scans, nicht aber Volumenserien aufgezeichnet werden können.

4.2.2.4 Quantifizierung von Mukustransport in der Nase

Zeitreihen, die mit emOCT bei 150 Hz aufgenommen wurden, erlauben es, die Transportgeschwindigkeit des Mukus über das Epithelium in der *Concha nasalis medialis* zu visualisieren (Abb. 4.18), nachdem die vorhandene Globalbewegung durch eine rigide Registrierung kompensiert wurde. Die Restbewegung des Gewebes nach Registrierung beträgt weniger als $5\ \mu\text{m}$, während sich der Mukus in einer halben Sekunde über $70\ \mu\text{m}$ bewegt. Die Auswertung erfolgte in dieser Zeitserie manuell, indem die Position von Strukturen im Mukus und die Position eines Gefäßes im Gewebe aus den Bildern der Serie bestimmt wurde. Über den Betrachtungszeitraum von $0,5\ \text{s}$ wurde für den Mukus eine mittlere Geschwindigkeit von $165\ \mu\text{m}/\text{s}$ bestimmt.

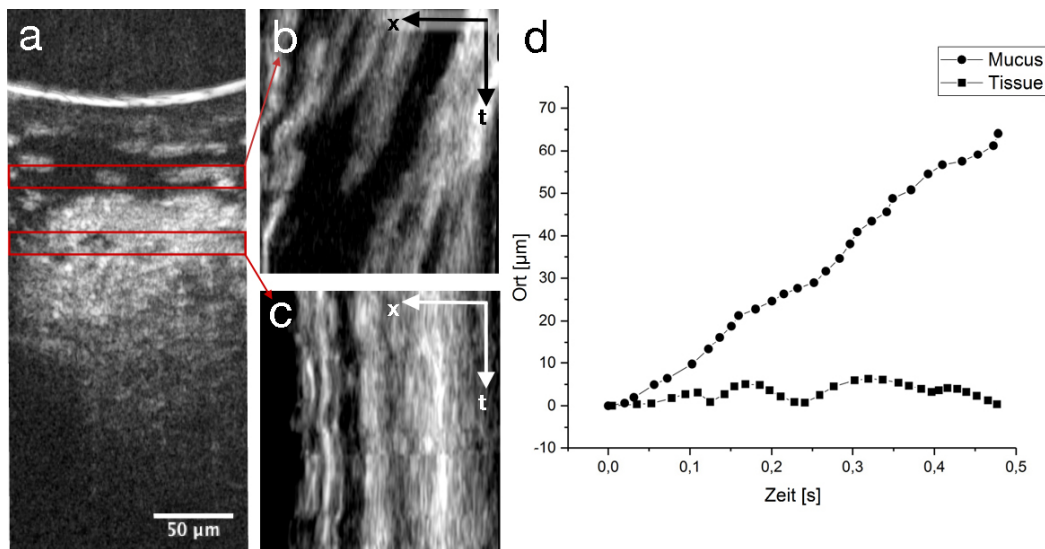


Abbildung 4.18: Quantifizierung des Schleimtransports in der menschlichen Nase *in vivo*. a) Ein repräsentatives Bild aus der B-Scan Zeitserien zeigt Mukus und Epithel. b) Extrahierte Signale aus der Zeitserie entlang der x-Achse in der Tiefe des Mukus. c) Orts-Zeit-Darstellung für eine Schicht im Gewebe. d) Auswertung von Bewegung markanter Strukturen. Aus diesen Daten wurde die laterale Bewegung in beiden Schichten berechnet. (Visualisierung A.9)

5 Kapitel 5

5 Diskussion

5.1 mOCT als mikroskopisches Verfahren

Die mOCT kombiniert eine hohe axiale und laterale Auflösung mit einer hohen Messgeschwindigkeit. In dieser Arbeit wurde eine axiale Auflösung von 1,3 μm in Luft bzw. 1,0 μm in Gewebe bei einer A-Scanrate von 127 kHz (130 MHz Pixelrate) erreicht. Die laterale Auflösung betrug je nach verwendeter NA bis zu 0,36 μm .

Ziel der Entwicklung dieses Verfahrens war es, die Lücke zwischen makroskopischen Verfahren wie z. B. der Computertomografie, der magnetischen Resonanztomografie, aber auch klassischer OCT und der Intravitalmikroskopie zu schließen. Die gängigen Methoden der Intravitalmikroskopie sind zurzeit Fluoreszenz basierte Techniken wie die konfokale Mikroskopie oder die Multiphotonenmikroskopie und die konfokale Reflexionsmikroskopie. Auch wenn diese Techniken einen großen Beitrag zum Fortschritt in der Biologie beitragen, gibt es Fragestellungen, wie z. B. den Mukustransport, bei denen diese Techniken nicht weiterhelfen. So besitzt Mukus keine Autofluoreszenz und die Bildgebungsgeschwindigkeit ist mit einer Pixelrate von weniger als 10 MHz zu gering [104].

Intravitalmikroskopie, welche auf reflektiertem oder gestreutem Infrarotlicht basiert, ist schnell und nebenwirkungsarm, hat aber bisher nur bedingt den Weg in die biologische Grundlagenforschung gefunden. So ist die Intravitalmikroskopie nach wie vor ein Nischenbereich innerhalb der hochauflösenden OCT. PubMed listet unter den Suchbegriffe „OCM“, „ μOCT “ oder „mOCT“ und „*in vivo*“ lediglich 51 Veröffentlichungen auf. Anwendungen sind neben der Beobachtung von Mukustransport allgemein die Darstellung zellulärer und subzellulärer Strukturen im Bereich der Augen [105], des Gehirns [106, 107] oder die funktionelle Darstellung der Herzfunktion [108, 109]. Das mOCT wurde neben der Untersuchung von Mukustransport auch zur intravitalem Darstellung von Lymphgefäßen in der Cornea von Mäusen genutzt [110].

Bei einem Großteil der Arbeiten wurden NAs in einem Bereich zwischen 0,12 NA und 0,16 NA genutzt, woraus eine laterale Auflösung zwischen 2,5 μm und 1,75 μm resultiert [70, 111, 112, 105]. Wenige Gruppen nutzten deutlich höher NAs, wie z. B. in den Arbeiten von Marchand et. al. [53], welche eine laterale Auflösung von 1,4 μm nutzten, oder das phasenstabile OCM von Ansari et.al. [51], womit eine laterale Auflösung von 0,4 μm gezeigt wurde. Die Verwendung von Abbildungsobjekten mit einer hohen numerischen Apertur führt neben einer hohen lateralen Auflösung auch zu einer Reduzierung des Tiefenmessbereiches.

Seit mehreren Jahren wird daher intensiv daran geforscht, den durch die laterale

Auflösung gegebenen Tiefenmessbereich zu vergrößern [69, 70, 113, 53, 114]. Hierfür wurden verschiedene Konzepte entwickelt, welche entweder Besselstrahlen [69], apodisierte Gaußstrahlen [70] oder mehrere Fokusse [71] verwenden. Oft sind diese Konzepte aber nur bedingt praktisch nutzbar, da sie prinzipbedingt zu Nebenbändern der PSF führen. Für einen idealen Besselstrahl beträgt beispielsweise der Abstand zwischen der Höhe des zentralen Peaks zu der Höhe des ersten Seitenbandes 8 dB. In streuendem Gewebe führt dies somit zu einer Anhebung des Untergrundes durch Nebenbänder [69, 113] und somit zu einer Reduzierung der Bildqualität. Auch wird die Komplexität des Aufbaus erhöht, was in der Praxis oftmals zu einer Verringerung der Sensitivität führt.

Die mOCT verzichtet aus diesen Gründen auf die Verwendung von Modifikationen der Apertur, um den Fokus zu verlängern. Vielmehr werden an die Bildgebung angepasste numerische Aperturen eingesetzt, welche einen gewissen Tiefenbereich mit optimaler Auflösung, die Bereiche darüber und darunter mit reduzierter lateraler aber immer noch optimaler axialer Auflösung abbilden. In vielen Fällen ist dies ausreichend, da entweder nur Vorgänge in wenigen Schichten interessieren, wie z. B. der Zilienschlag, oder die Auflösung lateraler Strukturen nicht relevant ist, sondern nur deren Dicke, wie dies bei ASL und Mukus der Fall ist. In dieser Arbeit relevante Parameter wie Transportgeschwindigkeit oder die Mukusdicke sind auch mit deutlich schlechterer lateraler Auflösung quantifizierbar.

Neben der hohen lateralen Auflösung zeichnet mOCT auch eine hohe axiale Auflösung aus. Trotz des bei spektralen Bandbreite von 400 nm großen Einflusses der Dispersion auf die Auflösung weicht die experimentell erreichte axiale Auflösung nur minimal von der theoretisch mit einem Hann-Fenster möglichen Auflösung von 1,26 μm ab. Dies wurde durch die Kombination von optischer und numerischer Kompensation der Dispersionunterschiede in Mess- und Interferenzarm erreicht. Dies ist so effizient, dass auf eine symmetrische Auslegung des Interferometers, welches automatisch zu gleicher Dispersion in beiden Armen führt, verzichtet werden konnte.

Ähnliche Auflösungen im Bereich von 1,0 μm bis 1,5 μm wurden auch von anderen Gruppen, welche Superkontinuumquellen verwenden, für OCT Messungen mit mikroskopischer Auflösung berichtet [70, 115, 116, 117]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde die Zentralwellenlänge auf 532 nm in Richtung des sichtbaren Spektralbereichs verschoben, was die axiale Auflösung um 15 % auf 0,7 μm erhöhte [53]. Aufgrund der Wellenlängenabhängigkeit der Rayleighstreuung führen die kürzeren Messwellenlängen in streuendem Gewebe zu einer geringeren Messtiefe. Zur Messung von Mukustransport durch die Trachealwand ist zu erwarten, dass diese Messwellenlängen zu einer Verschlechterung der Bildqualität unterhalb der *Lamina propria* führen würden.

Die auf Optimierung der Bildqualität basierende numerische Kompensation der Dispersion berücksichtigt auch die a priori nicht bekannte probeninhärente Dispersion. In den bisher veröffentlichten Arbeiten wurde die Dispersion entweder optisch oder numerisch mit einem Korrekturvektor, der an einer spiegelnden Grenzflächen be-

stimmt wurde, kompensiert [55, 56, 57]. Der hier verwendete Algorithmus, basierend auf dem von Hillmann et.al. [118] entwickelten Algorithmus für die numerische Refokussierung von lateralen Strukturen, benutzt hingegen beliebige axiale Strukturen, um den Korrekturvektor zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde bei der Untersuchung des Schleimtransportes der Korrekturvektor stets für den Bereich des Epithels der Trachea und der Grenzschicht zum Lumen optimiert. Dies kann auch örtlich aufgelöst in verschiedenen Bereichen oder Tiefen des Bildes geschehen, wenn die Dispersion der Probe räumlich variiert. Zukünftig soll dies auf Aufnahmen der Trachea angewendet werden, um die tiefenabhängige, probeninhärente Dispersion in jeder Tiefe auszugleichen.

5.2 mOCT zur Darstellung von Mukustransport *ex vivo* und *in vivo*

5.2.1 Ex vivo Messungen an Mastrachea

Durch die Kombination aus einer hohen lateralen und axialen Auflösung ist die mOCT sehr gut für die Darstellung von morphologischen Strukturen auf zellulärer und subzellulärer Ebene geeignet. Demonstriert wurde dies am Trachealgewebe der Maus. Die Verwendung des 0,8 NA Objektivs hat bzgl. der Darstellbarkeit von Strukturen in den Atemwegen keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem 0,5 NA Objektiv gezeigt. Die laterale Auflösung unterscheidet sich auch nur um 60 %. Bei Verwendung der konfokalen oder nichtlinearen Bildgebung würde auch die axiale Auflösung um den Faktor 2,5 abnehmen, wenn NA 0,5 statt 0,8 verwendet wird. Da bei der mOCT die axiale Auflösung durch das Spektrum und nicht durch die NA bestimmt wird, beeinflussen lediglich Unterschiede der lateralen Auflösung die Bildqualität in der Schärfenebene. Negativ wirkt sich die hohe NA auf den Tiefenbereich aus, der scharf darstellbar ist. Dieser verkleinert sich um den Faktor 2,5. Während also in konfokaler und nichtlinearer Mikroskopie eine hohe NA auch benötigt wird, um eine hohe axiale Auflösung zu erzielen, muss die NA in der mOCT nur so groß sein, dass eine ausreichende laterale Auflösung erzielt wird.

Eine weitere Stärke der mOCT liegt in der Visualisierung und Quantifizierung von zellulärer Dynamik. Durch Verwendung von hochnumerischen Objektiven konnten einzelne Zilien tragende Epithelzellen voneinander separiert und unabhängig analysiert werden. Bei vielen Untersuchungen der Zilienschlagfrequenz mit OCT [15, 119, 71] konnten einzelne Epithelzellen nicht separiert werden, da die laterale Auflösung nicht ausreichend war. Ansari et.al. zeigten mit einem phasensensitiven OCM [18] eine Separation der Epithelzellen nach Erhöhung der NA auf 0,8. Die axiale Auflösung lag bei 4,5 μm . Diese Separation einzelner Zellen ist z. B. für die Untersuchung von Anomalien wichtig, welche zu einer nicht gleichgerichteten Schlagbewegung oder Frequenz von benachbarten Epithelzellen führen [120].

Messungen erfolgten an der Innenseite der Trachea mit den Zilien direkt unter dem Objektiv. An einer geschlossenen Trachea konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine separierte Darstellung von Zilien tragenden Epithelzellen auch von außen durch die

Trachea möglich ist. Zwar führte der Durchgang durch das *Ligamentum annulare* aufgrund von Streuung und Aberrationen zu einer Abnahme der Qualität, dennoch war eine Quantifizierung der Zilienschlagfrequenz über die Fluktuation der Speckle möglich. Damit sind Messungen der Zilienschlagfrequenz *in vivo* im Mausmodell möglich. Fluktuation in der Ebene der Zilien waren allerdings nur sichtbar, wenn sich über den Zilien noch eine Flüssigkeits- oder Mukusschicht von mindestens 10 μm befand, welche die beiden Grenzflächen klar voneinander separiert. In den Wild-Typ und transgenen Tieren ist ohne Applikation von Kochsalzlösung die Dicke des ASL so gering, dass das dynamische Signal der Zilien nicht mehr vom Reflex der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht zu trennen war. Zilienschlagfrequenzen waren dann nicht mehr zu bestimmen. Eine Erhöhung des Dynamikbereichs durch ein Spektrometer mit einer höheren Full-Well-Kapazität oder der Auflösung mag in Zukunft eine Messung von Zilienaktivität bei einer wenige Mikrometer dicken ASL ermöglichen.

5.2.2 Analyse der Transportmechanismen in der Maus

Durch die mOCT konnte der Mukustransport direkt bei spontan atmenden, nicht-intubierten Mäusen mit optischen Methoden visualisiert werden. Im Gegensatz zu einer in 2016 veröffentlichten Studie [71], welche nur den Zilien vermittelten Transport beobachten konnte, war dies ohne den Einsatz von Endoskopen in der Trachea möglich. Prinzipiell gestaltet sich die Messung des durch Luftstrom, wie z. B. Husten, vermittelten Transports bei der Einbringung von Endoskopen in die Trachea schwierig. So werden durch das Endoskop Teile der Trachea geblockt, was zu einer Reduzierung des Querschnittes führt und somit die Messung verfälscht. Des Weiteren führt das Einbringen des Endoskops auch zu Irritationen, welche die Schleimproduktion anregen können. Mit mOCT konnten über ziliaren Transport hinausgehende Mechanismen studiert werden, da auf eine größere Intervention in das pulmonologische System verzichtet werden konnte. Sowohl während der Aspiration von 30 μl Flüssigkeit als auch in der daran anschließenden Exhalation-Phase wurde eine hohe Transportgeschwindigkeit von 17 mm/s bzw. 24 mm/s beobachtet. Dies stellt einen unerwartet schnellen Transport dar. Für Zilien vermittelten Transport werden hundertfach geringere Geschwindigkeiten [121, 21] erwartet. Es liegt daher ein durch Luftstrom getriebener Transport wie Atmung, Husten oder eine reflexartige Inhalation nahe. In der Literatur gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen zu Luftstrom vermittelten Mukustransport in den Atemwegen. Eine Arbeit von Blake [4] aus dem Jahre 1975 widmet sich allerdings ausführlich diesem Thema. Der durch die Atmung erzeugte Luftstrom induziert Schubspannung auf dem Flüssigkeitsfilm. Die Geschwindigkeit des Luftstroms, die Dicke der Flüssigkeit und deren Viskosität bestimmen die Transportgeschwindigkeit. Für Mukus unter normalen Bedingungen werden nach dieser Arbeit allerdings nur Werte in einem Bereich um 100 μm pro Sekunde angegeben, welche auch für den durch Zilien vermittelten Transport im Menschen erwartet werden. Dabei bezog sich Blake nur auf die durch normale Atmung induzierten Luftströme. Trotzdem lassen sich folgende Schlussfolgerungen aus den

Arbeiten ziehen. Zum einen steigt die Transportgeschwindigkeit, wenn die Strömungsgeschwindigkeit zunimmt. Ist Luftstrom durch einen Reflex wie z. B. Husten induziert, so erhöht sich durch die Aktivität der Bauchmuskulatur die Strömungsgeschwindigkeit um das bis zu 23-fache gegenüber der ruhigen Atmung in der menschlichen Trachea [122]. Während der Applikation der Salzlösungen wurde auch eine starke Bewegung des Brustkorbes der Maus beobachtet. Dies ist wahrscheinlich eine Art Husten, der kurzzeitig hohe Geschwindigkeiten der Luftströmung und damit auch der Flüssigkeit verursacht. Die Fähigkeit von Mäusen zu husten wurde lange Zeit in der Fachwelt bezweifelt und konnte erst 2013 durch die Detektion von Hustengeräuschen [123] nachgewiesen werden. Des Weiteren lässt sich aus den Ergebnissen der Arbeit von Blake ableiten, dass die Transportgeschwindigkeit mit der Viskosität des Mukus abnimmt. Die applizierte Kochsalzlösung hat im Vergleich zum Mukus eine sehr niedrige Viskosität was ebenfalls zu der hohen Transportgeschwindigkeit beitragen kann.

Auch wenn die genauen Transportmechanismen noch nicht bestimmt werden konnten, stellt diese Arbeit den Transportvorgang erstmalig *in vivo* mit einer optischen Methode räumlich und zeitlich aufgelöst dar und demonstriert erstaunlich hohe Transportgeschwindigkeiten.

5.2.3 Tierstudie zur Hydratisierung in β -ENaC überexprimierten Mäusen

Nach Untersuchung der Transportmechanismen in Wildtype-Tieren ohne CF-Symptomatik wurde der Effekt hypotonischer Kochsalzlösung an β -ENaC überexprimierten Mäusen untersucht. Direkt während der Aspiration der nasal applizierten 30 μ l Flüssigkeit wurde erwartungsgemäß eine plötzliche, starke Erhöhung der Dicke der ASL beobachtet, welche innerhalb weniger Minuten auf ihr Basisniveau zurückkehrte. Dies war unabhängig davon, ob hypertone oder isotone Kochsalzlösung appliziert wurde. *In vitro* Studien zeigten, dass die direkte Resorption von zusätzlicher Flüssigkeit erst über einen Zeitraum von Stunden und nicht wenigen Minuten erfolgt [124]. Die Flüssigkeit wird nach Inhalation teilweise wieder Richtung Larynx transportiert und fließt über den Ösophagus ab. Zum Teil verteilt sie sich in die tieferen Bereiche der Lunge bis zu den Alveolen, wo sie durch die erheblich größere Oberfläche schnell resorbiert werden kann.

Entgegen der Erwartung wurde in den β -ENaC-Mäusen vor Applikation von Kochsalzlösung keine erhöhte Mukusmenge in der Trachea beobachtet. Erst nach der Gabe von isotoner bzw. hypertoner Kochsalzlösung konnte eine massive Mobilisierung von Schleim beobachtet werden, der sich offensichtlich in den unteren Atemwegen angesammelt hatte. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Kochsalzlösungen festgestellt. Hypertonische Kochsalzlösung bewirkte gegenüber isotonischer Kochsalzlösung eine stärkere Mobilisierung von Mukus. Auch konnten Hinweise auf Unterschiede bezüglich der Eigenschaften des Mukus gefunden werden. Zwar konnten mit mOCT visköse Eigenschaften des Mukus nicht direkt gemessen werden, aber hypertone Kochsalzlösung bewirkte eine gleichmäßigere Ver-

teilung des Mukus innerhalb der Trachea, was auf eine homogenere Konsistenz des Mukus hindeutet. Bei Gabe von isotoner Kochsalzlösung wurde signifikant weniger Mukus mit einer inhomogeneren Konsistenz mobilisiert. Der Mukus war sehr ungleichmäßig über das Atemwegsepithel verteilt, und staute sich bei vielen Tieren vor dem Larynx. In einem Tier führte dies zu einer kompletten Blockade der Trachea, in dessen Folge die Maus vor Beendigung des Experimentes verstarb.

Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurde ein Gleichförmigkeitsindex für die Konsistenz des Mukus definiert. Dieser basiert auf dem Vergleich der Schleimhöhe über dem Epithel an vier verschiedenen Messzeitpunkten. Dieser quantitative Parameter konnte die qualitativen Beobachtungen bestätigen. Diese Ergebnisse passen damit auch hervorragend in das Bild, dass eine geringere lokale Viskosität mit einer höheren, verbesserten Transportfähigkeit korreliert [125]. Diese Ergebnisse sind auch im Einklang mit der klinischen Erfahrung, dass die Gabe von Kochsalzlösung zu einer Mobilisierung von Schleim führt. Insbesondere unterstützen die hier beobachteten Unterschiede der Wirkung von iso- und hypertoner Kochsalzlösung auf den Schleimtransport eine klinische Studie, die zeigte, dass die Inhalation hypertoner Kochsalzlösung zu einer deutlich langfristigeren Verbesserung der CF-Therapie führte [32]. In dieser Studie inhalierten CF-Patienten zweimal täglich über 48 Tage entweder isotonische oder hypertone Kochsalzlösung. In der Versuchsgruppe, welche hypertone Kochsalzlösung inhaliert hatte, konnten signifikant höhere Lungenfunktionswerte festgestellt werden.

Unsere Tierstudie zeigt, dass mOCT in der Lage ist, den Einfluss von Therapeutika auf den Schleimtransport zu quantifizieren. Schleimmobilisierung, Zähigkeit und Schleimtransport lassen sich nach Gabe von Therapeutika beurteilen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit mOCT erstmalig Mobilisierung und Transport von Mukus in einem Modellsystem für zystische Fibrose auf die Gabe von in der klinischen Therapie verwendeter Kochsalzlösung untersucht werden konnte. Insbesondere die Kombination hoher Auflösung mit einer hohen Messgeschwindigkeit ermöglichte Messungen an spontan atmenden, nicht-intubierten Mäusen. Es konnten Aspekte des Schleimtransportes beurteilt werden, welche sich in einem *ex vivo* Modell nicht untersuchen lassen.

5.3 Klinische Translation: endoskopische mOCT

Die Möglichkeit, Zilienaktivitäten und Schleimtransport mit mOCT beim Menschen zu messen, ist von großem Interesse für die Diagnose von Krankheiten wie primärer ziliärer Dyskinesie (PCD) oder zystischer Fibrose (CF). Bisher war dies allerdings nicht möglich, da entsprechende Endoskope, welche die nötige Auflösung erreichen, nicht verfügbar waren. Der einfachste Zugang zu Zilien tragendem Atemwegsgewebe ist die Nase. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei verschiedenen Lungenerkrankungen, wie z. B. CF, auch Anomalitäten im Bereich der *Concha nasalis* zeigen [126, 127, 128, 129]. Dieser Bereich der menschlichen Nase ist bereits mit einem starren Endoskop mit

einer Länge von 40 mm erreichbar und Untersuchungen dort sind weit weniger invasiv wie eine Bronchoskopie. Das in dieser Arbeit vorgestellte starre Endoskop bietet mit 45 mm eine hinreichende Länge und mit 1,5 μm eine ausreichende Auflösung für die Darstellung der Zilienaktivitäten und des Mukustransportes.

Mit einem frei gehaltenen Endoskop mikroskopische Auflösung zu erzielen, ist wegen der Bewegungen von Patient und Arzt ein großes Problem. Allein der natürliche Tremor der Hand verschiebt kontinuierlich die Fokusslage um ca. 100 μm . Dies entspricht der Schärfentiefe einer Abbildung mit 0,1 NA, entsprechend einer lateralen Auflösung von 2,8 μm . Somit ist eine Verlängerung der Fokustiefe nützlich, um interessierende Ebenen im Gewebe abbilden zu können.

Endomikroskopische OCT mit unter 2,5 μm axialer Auflösung und verlängerter Fokustiefe wurde unter Verwendung von Bessel-Strahlen [69, 114] oder von apodisierten Gaußstrahlen [70, 130] demonstriert. Der Bessel-Strahl führt zu einer signifikanten Verlängerung der Fokustiefe um das Vierfache und ermöglichte eine hochauflösende OCT-Elastographie bei Kleintieren [114]. Dieses System erreichte eine laterale Auflösung von 1,6 μm und einer axialen Auflösung von 2,2 μm . In ersten *ex vivo* Messungen wurden damit quantitative Messung elastischer Eigenschaften von Silikonphantomen und von einem extrahierten, malignen Pankreastumor der Maus demonstriert. Messungen wurde lediglich auf einem optischen Tisch realisiert und das Endoskop kann bisher nicht mobil zur Untersuchung an Patienten eingesetzt werden. Durch die unvermeidlichen Seitenbänder des Bessel-Strahls wird die Kontrastempfindlichkeit, wie in Abschnitt 5.1 demonstriert, stark reduziert. Dies macht sich insbesondere bei der Darstellung zellulärer Strukturen des Gewebes negativ bemerkbar.

Den gleichen Nachteil hat die μOCT , welche einen ringförmig apodisierten Gaußstrahl zur Beleuchtung und Detektion verwendet. Auch dieses Design führt zu Nebenbändern, wenngleich diese weniger stark ausgeprägt sind, als dies der Fall bei dem Bessel-Strahl ist. Basierend auf μOCT wurde ein flexibles Endoskop zur Darstellung von Lungenerkrankungen beim Menschen demonstriert [130]. Es bietet eine laterale Auflösung von 4 μm , eine Schärfentiefe von 170 μm und bis zu 40 Bilder pro Sekunde und ermöglicht die Messung von verschiedenen Parametern, wie etwa dem Zilienschlag oder dem Transport von Mukus. Die Darstellung von einzelnen, z. B. Zilien tragenden Epithelzellen ist damit nicht möglich.

In dieser Arbeit wurden chromatische und sphärische Aberrationen für die Verlängerung der Fokustiefe genutzt. Chromatische und sphärische Aberrationen vergrößern die Fokustiefe auf Kosten der lateralen und der axialen Auflösung. Dafür werden Seitenbänder größtenteils vermieden. Die Verringerung der lateralen Auflösung durch Aberration ist offensichtlich. Weniger offensichtlich ist auch ein Verlust an axialer Auflösung. In erster Näherung ist bei der OCT die axiale Auflösung unabhängig von der bildgebenden Optik. Sie wird nicht durch die von der Optik übertragbaren Raumfrequenzen des Winkelspektrums, sondern durch die übertragbaren Bandbreiten der spektralen Frequenzen bestimmt. Im Fall von Aberrationen ist diese strikte Trennung nicht mehr gegeben, da Aberrationen zu einer Dämpfung von spektralen

Frequenzen führen können. So induzieren die chromatischen Längsaberrationen eine frequenzabhängige Verschiebung des Fokus. Auf der einen Seite führt dies wegen der Dämpfung des Spektrums zu einer Reduzierung der Amplitude der spektralen Komponenten, die jeweils aus jeder Ebene genutzt werden können, und somit zu einer Reduzierung der axialen Auflösung. Auf der anderen Seite verlängert sich aber auch die Fokustiefe. Ebenfalls beeinflussen sphärische Aberrationen die axiale Auflösung. Durch Interferenzen im aberrierten Strahl löschen sich spektrale Frequenzen entlang der optischen Achse auf, was zu einer reduzierten axialen Auflösung führt.

Bei der Entwicklung des Endoskops wurde darauf geachtet, dass die Aberrationen nicht zu einer zu großen Reduzierung der axialen Auflösung führen. Im Vorfeld wurde daher intensiv der Einfluss von Aberrationen auf die Bildgebung simuliert, um einen Parameterraum für die Auslegung zu erhalten. Im Anschluss erfolgte die Auslegung der Endoskopoptik unter Beachtung der Aberrationen. So wurde eine Auflösung besser als $2\ \mu\text{m}$ über eine Bildtiefe von $35\ \mu\text{m}$ erreicht. Im Fokus wurde eine laterale Auflösung von weniger als $1,5\ \mu\text{m}$ erreicht, welche sich entlang der optischen Achse deutlich langsamer als bei einem aberrationsfreien Strahl verschlechterte. Sowohl die sphärische als auch die chromatische Aberration führten zu einer Verlängerung des Fokus, welcher quadratisch mit der Abnahme der lateralen Auflösung skaliert [77]. Dieser Effekt wurde für sphärische Aberrationen bereits außerhalb der OCT gezeigt [131, 132]. Durch die Simulation der emOCT-Bildgebung mit den entsprechenden bildgebenden Parametern konnte gezeigt werden, dass die Aberrationen zu einer signifikanten Erhöhung der Fokustiefe beitragen, wodurch der Tiefenbereich, in dem kleine zellähnliche Strukturen unterschieden werden können, vergrößert wird. Dieses zeigte sich bei der Darstellung von Nasenschleimhautgewebe als nützliche Verbesserung. Bei einer NA von 0,23 würde man ohne Aberrationen eine Fokustiefe von nur $9\ \mu\text{m}$ erwarten. Messungen mit dem emOCT zeigten, dass die Signalthöhe und die laterale Auflösung über $35\ \mu\text{m}$ beibehalten wurden. Dadurch wurde *in vivo* eine hervorragende Sichtbarkeit kleiner Gewebestrukturen in B-Scans der *Concha nasalis in vivo* erreicht. Strukturen, die sonst nur in histologischen Schnitten zu sehen sind, wurden durch emOCT dargestellt. Die hohe Bildgeschwindigkeit von bis zu 160 fps ermöglicht die Visualisierung von zellulärer Dynamik wie z. B. Blutfluss. Auch konnte Mukustransport in der humanen Nase nicht nur visualisiert, sondern auch quantifiziert werden.

6 Kapitel 6

Ausblick

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war es, den Transport von Mukus *in vivo* sowohl im Tier als auch im Menschen mit einer hohen Zeitauflösung und einer hohen räumlichen Auflösung darzustellen, was mit der Entwicklung der mikroskopischen und endomikroskopischen OCT erreicht wurde. Während der durchgeführten Studien haben sich neue biologische Fragestellungen und Ideen für die technologische Weiterentwicklung aufgetan.

6.1 mOCT

Für die hier vorgestellten Experimente begrenzt nicht die Sensitivität, sondern der Dynamikbereich der OCT-Bilder die Bildqualität. In den meisten Messungen musste die Bestrahlungsstärke auf die Probe reduziert werden, um nicht die Kamera des Spektrometers durch starke Signale aus den oberflächlichen Gewebeschichten zu sättigen. Der erreichbare Dynamikbereich wird durch die Sättigungskapazität der Zeilenkamera, welche bei der in der mOCT verwendeten Kamera $18000 e^-$ betrug, und das zusätzliche Rauschen durch die Lichtquelle, nicht aber durch die Effizienz des Interferometers begrenzt. Um den Dynamikbereich zu erhöhen, müsste eine Spektrometerkamera mit einer höheren Sättigungskapazität eingesetzt werden. Kürzlich wurde eine speziell für die OCT entwickelte Zeilenkamera (OCTA Plus, Teledyne e2V, Saint Egrève Cedex, Frankreich) mit einer Geschwindigkeit von 250.000 Linien pro Sekunde und einer Sättigungskapazität von $200.000 e^-$ vorgestellt. Die Verwendung der OCTA Plus Kamera würde zu einer Verdoppelung der Geschwindigkeit führen und einen mit 72 dB um 11 dB höheren Dynamikbereich, bezogen auf die Kamera, gegenüber der im mOCT verwendeten Basler Sprint ermöglichen. Das Rauschen der Lichtquelle hat seinen Ursprung in Puls zu Puls Variationen, welche bei der Erzeugung durch nichtlineare Effekte entstehen. Der Einfluss des Rauschens lässt sich durch das Mitteln möglichst vieler Pulse innerhalb der Belichtungszeit eines A-Scan reduzieren. Da eine Reduzierung der Geschwindigkeit für die hier vorgestellten Experimente keine Option ist, müssten Änderungen auf der Lichtquellenseite vollzogen werden, indem die Pulswiederholrate von jetzt 350 MHz deutlich erhöht wird. Der Einfluss des Lichtquellenrauschens kann vollständig eliminiert werden, wenn das System mit zwei Spektrometern, welche als balancierter Detektor, wie durch Kuo et.al. [133] beschrieben, aufgebaut wird.

Die Tierstudie legt nahe, dass Verbesserungen des experimentellen Aufbaues einen detaillierten Einblick in den Mukustransport ermöglichen würden. So ist eine Verlegung der Trachea durch Mukus wegen des zu kleinen axialen Sichtfeldes mit der

mOCT nicht zu visualisieren. In Abschnitt 4.1.2 konnte gezeigt werden, dass mit klassischer OCT der gesamte Durchmesser der Trachea dargestellt werden kann. Für eine Erweiterung des mOCT um einen OCT-Kanal, der bei einer Auflösung von 10 μm Bildfelder von 10 mm oder mehr bietet, kann dieselbe Lichtquelle genutzt werden, welche ein kontinuierliches Spektrum von 400 nm bis hin zu 2400 nm liefert. Neben der bisher zwischen 550 nm und 950 nm genutzten Strahlung, kann der Spektralbereich um 1300 nm für OCT mit geringer Auflösung ausgekoppelt werden. Der Mukustransport in der Luftröhre wurde nur in B-Scans visualisiert. Damit konnte nur die Bewegungskomponente des Mukus entlang der Scanrichtung quantifiziert werden. Basierend auf *ex vivo* Experimenten gibt es Indizien dafür, dass der Mukus aus den submukösen Drüsen lateral strangförmig freigesetzt wird, was mit der Entfaltung der Mucine zusammenhängt [20]. *In vivo* konnte dies bisher nicht verifiziert werden. Auch konnte in der Studie an Gewebe von Schweinen ein Unterschied bei CF-Tieren bezüglich der Ausbreitung und Form des Mukus beobachtet werden. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass Transportstörungen auch mit der Form des Mukus und dessen Verteilung in der Trachea ausgehend von den Drüsen zusammenhängen. Um diese Frage *in vivo* zu verifizieren, wäre eine hoch aufgelöste dreidimensionale Darstellung des Mukustransports nötig. Dies macht eine Erhöhung der Bildgebungsgeschwindigkeit um mindestens eine halbe Größenordnung notwendig. Zurzeit werden solche hohen Geschwindigkeiten ausschließlich durch OCT-Systeme, die mit einer durchstimmbaren Lichtquelle wie etwa einem Fourier-Domain-Mode-Locked (FDML) [134], oder ein VESCL-Laser [134] in einem Wellenlängenbereich von 1060 nm, 1300 nm und 1550 nm arbeiten, erreicht. Mit dem bisher erreichten Durchstimmbereich von 143 nm bei einer Zentralwellenlänge von 1060 nm konnte nur eine axiale Auflösung von 6 μm erreicht. Diese wäre nicht hoch genug, um die kleinen Änderungen in der ASL zu quantifizieren. Eine Möglichkeit, die Lichtquellen zu nutzen, wäre durch Frequenzverdoppelung die Auflösung zu erhöhen. Im Falle der FDML-Quelle mit einer Zentralwellenlänge von 1060 nm würde dies zu einer axialen Auflösung von ca. 2,75 μm führen. Allerdings wäre dies immer noch um den Faktor zwei schlechter als die jetzt erreichte Auflösung. Zudem ist der ganze Prozess relativ ineffizient und mit einem hohen technischen Aufwand verbunden. Naheliegender wäre es, eine schnellere Linienkamera für das Spektrometer zu verwenden. Seit kurzem ist eine Linienkamera verfügbar, welche prinzipiell für SD-OCT geeignet ist und 600 kHz Bildwiederholrate bei einer Auflösung des Spektrums mit 2048 Pixeln bietet (xposure camera, AIT Austrian Institute of Technology, Wien, Österreich). Mit dieser wäre es z. B. möglich, bis zu 15 Volumen pro Sekunde mit 512 px x 64 px aufzuzeichnen. Damit könnte die dreidimensionale Bewegung des Mukus dargestellt werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Ermittlung der ASL-Dicke per Hand, da die Messpunkte sich durch die Bewegung der Trachea von B-Scan zu B-Scan verschoben haben. Eine zuverlässige, automatisierte Auswertung wäre nur möglich, wenn die gesamte Zeitserie nahezu vollständig registriert vorliegen würde, da dann die Messpunkte nur einmalig definiert werden müssten. Die Aufnahme von asymmetrischen Volumina mit nur 10 Pixeln in eine Scanrichtung würde die dreidimensionale Registrierung

von B-Scans, für einen vollen Bewegungsausgleich, ermöglichen. Durch Mittelung der B-Scans kann zudem die Bildqualität verbessert und Speckle verringert werden. Beides würde daher den Weg für eine zuverlässige automatisierte Auswertung der Datenmengen ebnen.

Nach der erfolgreichen, qualitativen Analyse von Mukustransport in einer Studie mit 20 Tieren soll die Wirkung von HCO_3^- auf den Mukustransport in β -ENaC überexprimierten Mäusen getestet werden. HCO_3^- ist notwendig zur Entfaltung der Mucine und könnte die Eigenschaft des hochviskosen klebrigen Schleims bei CF positiv beeinflussen.

mOCT kann prinzipiell bei allen Lungenerkrankungen, die Mukustransportstörungen bewirken, zur Untersuchung von Krankheitsmechanismen und zur Therapieoptimierung eingesetzt werden. Insbesondere die Visualisierung und Quantifizierung von Mukus konnte aufgrund fehlender Bildgebungsmöglichkeiten bisher *in vivo* nicht umfassend untersucht werden.

6.2 emOCT

Die emOCT ermöglicht eine Visualisierung von zellulären Strukturen der Nasenschleimhaut. Die Bildgebung hat aufgrund der Möglichkeit, Mukustransport zu quantifizieren, großes diagnostisches Potenzial für die direkte Therapiekontrolle bei Patienten mit CF. Da die emOCT auch dynamische Vorgänge auf zellulärer Ebene visualisieren kann, hat sie auch das Potenzial, aufwendige und unangenehme Diagnoseverfahren wie die Bürstenhistologie, welche zur Diagnose der primären ziliären Dyskinesie bei Kindern eingesetzt wird, zu ersetzen. Diese Bildgebung hat für eine Reihe von Lungenerkrankungen großes diagnostisches Potenzial. Bisher konnten nur exemplarische Messungen an gesunden Probanden durchgeführt werden. Zur Klärung, welchen Mehrwert die hohe Auflösung für die Forschung und klinische Diagnostik bringt, sind letztendlich klinischen Studien mit Patienten notwendig. Hierfür ist es nötig, eine kliniktaugliche Version zu entwickeln, welche erhöhte Anforderungen bezüglich Sicherheit und Funktionalität erfüllt und einen Einsatz im Rahmen einer „Prüfer initiierten klinischen Studie“ (IIT, investigator initiated trial) erlaubt.

Mit der bisher eingesetzten 0°-Optik sind einige wenige Strukturen wie z. B. die Zilien nur schwer zu visualisieren, da diese primär seitlich auf der am besten zu erreichenden *Concha nasalis inferior* zu finden sind. Für bestimmte Einsatzorte wäre daher eine 90°-Optik eine sinnvolle Ergänzung. Leider war eine Quantifizierung des Zilienschlages wegen der Patientenbewegungen nicht möglich. Die Implementierung einer schnellen volumetrischen Bildgebung, welche eine Registrierung in alle drei Raumrichtungen ermöglichen würde, und einer Vorrichtung zur Immobilisierung des Endoskops am Eingang der Nase, könnten Bewegungsartefakte soweit reduzieren, dass eine Quantifizierung von Zilienschlag möglich werden könnte.

Viele Lungenerkrankungen wie die zystische Fibrose (CF), Asthma oder COPD gehen einher mit der Veränderung des Mukus. Oftmals führen diese Veränderungen zu einer Hemmung der Reinigung der Atemwege. Die genauen Mechanismen sind in vielen Fällen noch nicht bekannt. Daher ist die Rolle des Mukus in Lungenerkrankungen seit Jahren ein aktives Forschungsfeld. An vielen Stellen könnte die Effektivität klinischer Forschung auf diesem Gebiet gesteigert werden, wenn es möglich wäre, den Mukus und dessen Reaktion auf therapeutische Interventionen direkt und nicht über exogene Faktoren, wie zum Beispiel Überlebenszeit in Tierversuchen oder die Verbesserung der Lungenfunktion, studieren zu können.

Dazu wurde in dieser Arbeit eine Technologie entwickelt welche die Untersuchung des Mukustransportes sowohl an Kleintieren wie Mäusen als auch in den oberen Atemwegen des Menschen ermöglicht. Wesentliche Voraussetzungen dafür sind sowohl eine hohe räumliche Auflösung, um dynamische Veränderungen auf zellulärer Ebene visualisieren zu können, als auch eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit, um unempfindlich gegenüber Bewegungen zu sein.

In dem ersten Teil der Arbeit wurde daher ein Mikroskopie-System für die intravitale Bildgebung von Mukustransport in Mäusen entwickelt. Dazu wurde die optische Kohärenztomografie zur mikroskopischen optischen Kohärenztomografie (mOCT) weiterentwickelt. Durch die Verwendung einer schnellen Linienkamera für das Spektrometer konnte eine A-Scanrate von 127 kHz (130 MHz Pixelrate) erreicht werden, womit bis zu 160 B-Scans pro Sekunde dargestellt werden konnten. Durch Steigerung der räumlichen Auflösung um das Zehnfache, sowohl axial als auch lateral, war es möglich, mikroskopische Strukturen darzustellen. Dabei wurde eine axiale Auflösung von 1,3 μm in Luft bzw. 1 μm im Gewebe erreicht. Die laterale Auflösung konnte über die Wahl des Objektivs variiert und damit an die Messaufgaben und an das zu untersuchende Objekt angepasst werden. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Objektiven wurden Auflösungen im Bereich von 1,75 μm bis hin zu 0,36 μm erreicht. Die Untersuchung von enukleiertem Trachealgewebe hat gezeigt, dass relevante zelluläre Strukturen wie z. B. Zilien, Epithelzellen und Mukus durch die mOCT mit mikroskopischer Auflösung visualisiert werden können. Die Möglichkeit mittels mOCT verschiedene Transportmechanismen des Mukustransportes zu visualisieren und quantifizieren wurde in einem Experiment an gesunden, spontan-atmenden Mäusen demonstriert. Dazu wurde mit Partikeln versetzte Kochsalzlösung nasal appliziert und sowohl die Aspirationsphase als auch die Exhalationsphase mittels mOCT untersucht. Dabei konnte nicht nur der gut untersuchte ziliare Transport, sondern auch ein in Mäusen in der Literatur bisher kaum beschriebener hundertfach

schnellerer Transportmechanismus verursacht durch eine hustenähnliche reflexartige Luftströmung gezeigt werden. In einer Tierstudie an β -ENaC überexprimierten Mäusen, welche als Modell für die zystische Fibrose dienen, wurde der Effekt von der Hydratisierung des Mukus durch isotone und hypertone Kochsalzlösungen, welche in der CF Therapie als Therapeutika eingesetzt werden, untersucht. Zum Vergleich wurde die Reaktion gesunder Tiere auf die Kochsalzlösungen studiert. Während in den gesunden Tieren kein Mukus freigesetzt wurde, erfolgte eine massive Mobilisation von Mukus in den β -ENaC überexprimierten Mäusen. Auch konnten Anhaltspunkte gefunden werden, dass hypertone Kochsalzlösung zu einem besseren Transport von Mukus führt. Die mOCT hat somit das Potenzial, ein direktes Feedback in der Entwicklung von Medikamenten im Bereich der zystischen Fibrose zu liefern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die mikroskopische OCT zu einer endoskopischen Version für die Untersuchung von Mukustransport am Menschen weiterentwickelt. Für die Bildgebung an der *Concha nasalis* wurde daher eine endoskopische Version der mOCT entwickelt. Das 4,5 cm lange, auf GRIN Linsen basierende Endoskop mit einem Durchmesser von 2,5 mm bietet eine isotrope räumliche Auflösung von 1,5 μ m. Dabei wurden sphärische und chromatische Aberrationen eingesetzt, um die Fokustiefe signifikant zu erweitern. Dadurch war es möglich, zelluläre Strukturen über einen Tiefenmessbereich von mehr als 100 μ m darzustellen. In ersten Messungen an Probanden mit einer Bildrate von 80 Hz konnten B-Scans der *Concha nasalis* gezeigt werden, auf denen die Ziliabewegungen, zelluläre Strukturen des Epithels, Gefäße und Blutzellen sichtbar waren. Die Transportgeschwindigkeit von Mukus wurde erfolgreich zu 0,165 mm/s bestimmt. Die endomikroskopische OCT hat das Potenzial, zur Diagnostik von Lungenerkrankungen, welche sich bereits in der Nasenschleimhaut manifestieren wie z. B. die zystische Fibrose, Asthma oder die primäre ziliäre Dyskinesie, eingesetzt zu werden.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Kirsch, C. May, D. Lorke, A. Winkelmann, W. Schwab, G. Hermann, und R. Funk, *Taschenlehrbuch Anatomie*. Georg Thieme Verlag, 2. Aufl., 2011.
- [2] C. A. Pope, D. V. Bates, und M. E. Raizenne, “Health effects of particulate air pollution: Time for reassessment?,” *Environmental Health Perspectives*, Vol. 103, S. 472–480, 1995.
- [3] D. Raeburn und M. Giembycz, *Airway Mucus: Basic mechanisms and clinical perspectives*. Birkhäuser Verlag, 1997.
- [4] J. Blake, “On the movement of mucus in the lung,” *Journal of Biomechanics*, Vol. 8, S. 179–190, 1975.
- [5] J. Schwegler, *Der Mensch. Anatomie und Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 2011.
- [6] J. Blake, “A note on mucus shear rates,” *Respiration Physiology*, Vol. 17, S. 394–399, 1973.
- [7] A. Livraghi und S. H. Randell, “Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance,” *Toxicologic Pathology*, Vol. 35, S. 116–129, 2007.
- [8] N. R. Friedman, R. Pachigolla, R. W. Deskin, und H. K. Hawkins, “Optimal technique to diagnose primary ciliary dyskinesia,” *Laryngoscope*, Vol. 110, S. 1548–1551, 2000.
- [9] K. Mosler, C. Coraux, K. Fragaki, J. M. Zahm, O. Bajolet, K. Bessaci-Kabouya, E. Puchelle, M. Abély, und P. Mauran, “Feasibility of nasal epithelial brushing for the study of airway epithelial functions in CF infants,” *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol. 7, S. 44–53, 2008.
- [10] J. Rutland, A. Dewar, T. Cox, und P. Cole, “Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure,” *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 35, S. 357–359, 1982.
- [11] J. Rička, N. Bogdanović, B. Krattiger, D. Holzmann, und M. Frenz, “In-vitro and in-vivo endoscopical detection of ciliary beat frequency,” *Photonic Therapeutics and Diagnostics II*, Vol. 6078, S. 1–8, 2006.
- [12] P. Delmotte und M. J. Sanderson, “Ciliary beat frequency is maintained at a maximal rate in the small airways of mouse lung slices,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 35, S. 110–117, 2006.
- [13] I. Yamaguchi und S. I. Komatsu, “Theory and applications of dynamic laser speckles due to in-plane object motion,” *Optica Acta*, Vol. 24, S. 705–724, 1977.
- [14] G. F. Attizzani, L. Patrício, und H. G. Bezerra, “Optical coherence tomography assessment of calcified plaque modification after rotational atherectomy,” *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, Vol. 81, S. 558–561, 2013.
- [15] L. Liu, K. K. Chu, G. H. Houser, B. J. Diephuis, Y. Li, E. J. Wilsterman, S. Shastry, G. Dierksen, S. E. Birket, M. Mazur, S. Byan-Parker, W. E. Grizzle, E. J. Sorscher, S. M. Rowe, und G. J. Tearney, “Method for quantitative study of airway functional microanatomy using micro-optical coherence tomography,” *PLoS ONE*, Vol. 8, S. 1–8, 2013.
- [16] S. Jonas, D. Bhattacharya, M. K. Khokha, und M. A. Choma, “Microfluidic characterization of cilia-driven fluid flow using optical coherence tomography-based particle tracking velocimetry,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 2, S. 2022–2034, 2011.
- [17] A. L. Oldenburg, R. K. Chhetri, D. B. Hill, und B. Button, “Monitoring airway mucus flow and ciliary activity with optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 3, S. 1978–1992, 2012.
- [18] R. Ansari, C. Buj, M. Pieper, P. König, A. Schweikard, und G. Hüttmann, “Micro-anatomical and functional assessment of ciliated epithelium in mouse trachea using optical coherence phase microscopy,” *Optics Express*, Vol. 23, S. 23217–23224, 2015.

- [19] P. R. Sears, W.-N. Yin, und L. E. Ostrowski, "Continuous mucociliary transport by primary human airway epithelial cells in vitro," *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 309, S. 99–108, 2015.
- [20] M. J. Hoegger, A. J. Fischer, J. D. McMenimen, L. S. Ostedgaard, A. J. Tucker, M. A. Awadalla, T. O. Moninger, A. S. Michalski, E. A. Hoffman, J. Zabner, D. A. Stoltz, und M. J. Welsh, "Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis," *Science*, Vol. 345, S. 818–822, 2014.
- [21] S. Bermbach, K. Weinhold, T. Roeder, F. Petersen, C. Kugler, T. Goldmann, J. Rupp, und P. König, "Mechanisms of cilia-driven transport in the airways in the absence of mucus," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 51, S. 56–67, 2014.
- [22] M. Kartagener, "Zur Pathogenese der Bronchiektasien," *Beiträge zur Klinik der Tuberkulose und spezifischen Tuberkulose-Forschung*, Vol. 83, S. 489–501, 1933.
- [23] M. Donnelly, K. S. Morgan, K. K. Siu, N. R. Farrow, C. S. Stahr, R. C. Boucher, A. Fouras, und D. W. Parsons, "Non-invasive airway health assessment: Synchrotron imaging reveals effects of rehydrating treatments on mucociliary transit in-vivo," *Scientific Reports*, Vol. 4, 2014.
- [24] G. Habermehl, *Pschyrembel klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, 260. Aufl., 1990.
- [25] T. Köhnlein und T. Welte, "Mukoviszidose (Zystische Fibrose)," *Pneumologie*, Vol. 11, S. 65–76, 2014.
- [26] S. Naehrig, C.-M. Chao, und L. Naehrlich, "Mukoviszidose," *Deutsches Ärzteblatt International*, Vol. 114, S. 564–574, 2017.
- [27] M. P. Boyle und K. De Boeck, "A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying CFTR defect," *The Lancet Respiratory Medicine*, Vol. 1, S. 158–163, 2013.
- [28] R. C. Boucher, "Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration," *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 13, S. 231–240, 2007.
- [29] L. Tang, M. Fatehi, und P. Linsdell, "Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel," *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol. 8, S. 115–121, 2009.
- [30] D. Borowitz, "CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis," *Pediatric Pulmonology*, Vol. 50, S. S24–S30, 2015.
- [31] Z. Zhou, J. Duerr, B. Johannesson, S. C. Schubert, D. Treis, M. Harm, S. Y. Graeber, A. Dalpke, C. Schultz, und M. A. Mall, "The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease," *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol. 10, S. 172–182, 2011.
- [32] M. R. Elkins, M. Robinson, B. R. Rose, C. Harbour, C. P. Moriarty, G. B. Marks, E. G. Belousova, W. Xuan, und P. T. Bye, "A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis," *The New England Journal of Medicine*, Vol. 354, S. 229–240, 2006.
- [33] C. M. Zehendner, H. J. Luhmann, und J. W. Yang, "A simple and novel method to monitor breathing and heart rate in awake and urethane-anesthetized newborn rodents," *PLoS ONE*, Vol. 8, S. 1–9, 2013.
- [34] S. Wolfensohn und M. Lloyd, *Handbook of laboratory animal management and welfare*. Wiley-Blackwell, 4. Aufl., 2013.
- [35] F. Picard, F. Depret, S. Zanotti-Cavazzoni, und S. Hollenberg, "Effect of anesthesia level on murine cardiac function," *F1000Research*, Vol. 165, S. 1–9, 2014.
- [36] J. G. White und W. B. Amos, "Confocal microscopy comes of age," *Nature*, Vol. 328, S. 183–184, 1987.
- [37] W. Denk, J. Strickler, und W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, Vol. 248, S. 73–76, 1990.
- [38] Pedro Elias Marques, "Intravital microscopy: Taking a close look inside the living organisms," *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6, S. 1603–1614, 2012.
- [39] U. Tauer, "Dynamic confocal imaging of living brain advantages and risks of multiphoton

- microscopy in physiology *Experimental Physiology* : Multiphoton microscopy is based on the simultaneous absorption of two photons emitted by a pulsed infrared experimental physiologist,” *Experimental Physiology*, Vol. 87.6, S. 709–714, 2002.
- [40] A. Klinger, L. Krapf, R. Orzekowsky-Schroeder, N. Koop, A. Vogel, und G. Hüttmann, “Intravital autofluorescence 2-photon microscopy of murine intestinal mucosa with ultra-broadband femtosecond laser pulse excitation: image quality, photodamage, and inflammation,” *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 20, S. 1–13, 2015.
- [41] D. M. Shotton, “Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens,” *J. Cell Sci.*, Vol. 94, S. 175–206, 1989.
- [42] C. J. Sheppard und A. Choudhury, “Image formation in the scanning microscope,” *Optica Acta*, Vol. 24, S. 1051–1073, 1977.
- [43] T. Wilson und C. J. Sheppard, *Theory and practice of scanning optical microscopy*. Academic Press, 1984.
- [44] C. J. Sheppard, “Depth of field in optical microscopy,” *Journal of Microscopy*, Vol. 149, S. 73–75, 1987.
- [45] R. C. Youngquist, S. Carr, und D. E. Davies, “Optical coherence-domain reflectometry: a new optical evaluation technique,” *Optics Letters*, Vol. 12, S. 158–160, 1987.
- [46] J. J. G. Fujimoto, W. Drexler, und J. J. G. Fujimoto, *Optical coherence tomography: technology and applications*, Vol. 7156. Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag, 2. Aufl., 2008.
- [47] M. Ang, A. Konstantopoulos, G. Goh, H. M. Htoon, X. Seah, N. C. Lwin, X. Liu, S. Chen, L. Liu, und J. S. Mehta, “Evaluation of a micro-optical coherence tomography for the corneal endothelium in an animal model,” *Scientific Reports*, Vol. 6, S. 1–7, 2016.
- [48] J. A. Izatt, M. R. Hee, G. M. Owen, E. A. Swanson, und J. G. Fujimoto, “Optical coherence microscopy in scattering media,” *Optics Letters*, Vol. 19, S. 590–592, 1994.
- [49] J. F. de Boer, R. Leitgeb, und M. Wojtkowski, “Twenty-five years of optical coherence tomography: the paradigm shift in sensitivity and speed provided by Fourier domain OCT [Invited],” *Biomedical Optics Express*, Vol. 8, S. 3248–3280, 2017.
- [50] D. Huang, *Optical coherence tomography*. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, 1993.
- [51] R. A. M. Abdul, *Quantitative measurement of cellular dynamics using spectral domain optical coherence phase microscopy*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2013.
- [52] U. Sharma, J. Kang, und N. Fried, “Fizeau optical coherence tomography: sensitivity optimization and system analysis,” (*CLEO*). *Conference on Lasers and Electro-Optics, 2005.*, Vol. 3, S. 799–805, 2005.
- [53] P. J. Marchand, A. Bouwens, D. Szlag, D. Nguyen, A. Descloux, M. Sison, S. Coquoz, J. Extermann, und T. Lasser, “Visible spectrum extended-focus optical coherence microscopy for label-free sub-cellular tomography,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 8, S. 3343–3359, 2017.
- [54] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, R. Zawadzki, B. Karamata, und T. Lasser, “Numerical dispersion compensation for partial coherence interferometry and optical coherence tomography,” *Optics Express*, Vol. 9, S. 610–615, 2001.
- [55] M. Wojtkowski, V. J. Srinivasan, T. H. Ko, J. G. Fujimoto, A. Kowalczyk, und J. S. Duker, “Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation,” *Optics Express*, Vol. 12, S. 2404–2422, 2004.
- [56] S. Makita, T. Fabritius, Y. Yasuno, und S. F. Makita Tapio; Yasuno, Yoshiaki, “Full-range, high-speed, high-resolution 1- μm spectral-domain optical coherence tomography using BM-scan for volumetric imaging of the human posterior eye,” *Optics Express*, Vol. 16, S. 8406–8420, 2008.
- [57] D. Hillmann, T. Bonin, C. Lührs, G. Franke, M. Hagen-Eggert, P. Koch, und G. Hüttmann, “Common approach for compensation of axial motion artifacts in swept-source OCT and dispersion in Fourier-domain OCT,” *Optics Express*, Vol. 20, S. 6761–6776, 2012.

- [58] W. M. Petroll und D. M. Robertson, “In vivo confocal microscopy of the cornea: New developments in image acquisition, reconstruction, and analysis using the HRT-Rostock corneal module,” *Ocular Surface*, Vol. 13, S. 187–203, 2015.
- [59] M. Rajadhyaksha, A. Marghoob, A. Rossi, A. C. Halpern, und K. S. Nehal, “Reflectance confocal microscopy of skin in vivo: From bench to bedside,” *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 49, S. 7–19, 2017.
- [60] E. Omar, “Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma - a systematic review,” *Head & Face Medicine*, Vol. 11, S. 1–27, 2015.
- [61] M. Goetz, A. Hoffman, P. R. Galle, M. F. Neurath, und R. Kiesslich, “Confocal laser endoscopy: new approach to the early diagnosis of tumors of the esophagus and stomach,” *Future Oncology (London, England)*, Vol. 2, S. 469–476, 2006.
- [62] T. D. Wang, S. Friedland, P. Sahbaie, R. Soetikno, P. L. Hsiung, J. T. C. Liu, J. M. Crawford, und C. H. Contag, “Functional imaging of colonic mucosa with a fibered confocal microscope for real-time in vivo pathology,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 5, S. 1300–1305, 2007.
- [63] C. MacAulay, P. Lane, und R. Richards-Kortum, “In vivo pathology: Microendoscopy as a new endoscopic imaging modality,” *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, Vol. 14, S. 595–620, 2004.
- [64] M. Pieper, H. Schulz-Hildebrandt, G. Hüttmann, und P. König, “Imaging of mucus clearance in the airways of living spontaneously breathing mice by optical coherence microscopy,” in *Proc. SPIE* (G. J. Tearney, T. D. Wang, M. J. Suter, S. Lam, und M. Brenner, Edt.), Vol. 9691, S. 969116, International Society for Optics and Photonics, 2016.
- [65] D. M. Huland, C. M. Brown, S. S. Howard, D. G. Ouzounov, I. Pavlova, K. Wang, D. R. Rivera, W. W. Webb, und C. Xu, “In vivo imaging of unstained tissues using long gradient index lens multiphoton endoscopic systems,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 3, S. 1077–1085, 2012.
- [66] M. T. Myaing, D. J. MacDonald, und X. Li, “Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope,” *Optics Letters*, Vol. 31, S. 1076–1078, 2006.
- [67] C. J. Engelbrecht, R. S. Johnston, E. J. Seibel, und F. Helmchen, “Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo,” *Optics Express*, Vol. 16, S. 5556–5564, 2008.
- [68] R. N. Stiles, “Frequency and displacement amplitude relations for normal hand tremor,” *Journal of applied physiology*, Vol. 40, S. 44–54, 1976.
- [69] R. A. Leitgeb, M. Villiger, A. H. Bachmann, L. Steinmann, und T. Lasser, “Extended focus depth for Fourier domain optical coherence microscopy,” *Optics Letters*, Vol. 31, S. 2450, 2006.
- [70] L. Liu, J. A. Gardecki, S. K. Nadkarni, J. D. Toussaint, Y. Yagi, B. E. Bouma, und G. J. Tearney, “Imaging the subcellular structure of human coronary atherosclerosis using micro-optical coherence tomography,” *Nature Medicine*, Vol. 17, S. 1010–1014, 2011.
- [71] K. K. Chu, C. Unglert, T. N. Ford, D. Cui, R. W. Carruth, K. Singh, L. Liu, S. E. Birket, G. M. Solomon, S. M. Rowe, und G. J. Tearney, “In vivo imaging of airway cilia and mucus clearance with micro-optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 7, S. 2494–2505, 2016.
- [72] H. Schulz-Hildebrandt, *Einfluss von sphärischen und chromatischen Aberrationen auf die optische Kohärenzmikroskopie*. Masterarbeit, Fernuniversität Hagen, 2015.
- [73] Bibi Saint-Pol, “Respiratory system complete.”
- [74] R. J. Pack, L. H. Al-Ugaily, G. Morris, und J. G. Widdicombe, “The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse,” *Cell and Tissue Research*, Vol. 208, S. 65–84, 1980.
- [75] J. Jahns, *Photonik: Grundlagen, Komponenten und Systeme*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2001.

- [76] P. M. Moselund, O. Bang, und C. L. Thomsen, *Long-pulse supercontinuum light sources*. Dissertation, Technical University of Denmark (DTU), 2009.
- [77] T. R. Corle und G. S. Kino, *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*. Academic Press, 1996.
- [78] J. C. Wyant, “White light interferometry,” in *Proc. SPIE*, Vol. 4737, S. 4115–4127, 2002.
- [79] W. Drexler, U. Morgner, F. X. Kärtner, C. Pitris, S. A. Boppart, X. D. Li, E. P. Ippen, und J. G. Fujimoto, “In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography,” *Optics Letters*, Vol. 24, S. 1221–1223, 1999.
- [80] a. D. Aguirre, P. Hsiung, T. H. Ko, I. Hartl, und J. G. Fujimoto, “High-resolution optical coherence microscopy for high-speed, in vivo cellular imaging,” *Optics Letters*, Vol. 28, S. 2064–2066, 2003.
- [81] R. Leitgeb, “Performance of Fourier domain vs. time domain optical coherence tomography,” *Opt Express*, Vol. 11, S. 889–894, 2003.
- [82] M. A. Choma, A. K. Ellerbee, C. Yang, T. L. Creazzo, und J. A. Izatt, “Spectral-domain phase microscopy,” *Optics Letters*, Vol. 30, S. 1162–1164, 2005.
- [83] M. Wojtkowski, V. J. Srinivasan, T. H. Ko, J. G. Fujimoto, A. Kowalczyk, und J. S. Duker, “Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation,” *Optics Express*, Vol. 12, S. 2404–2422, 2004.
- [84] A. Agrawal, T. J. Pfefer, P. D. Woolliams, P. H. Tomlins, und G. Nehmetallah, “Methods to assess sensitivity of optical coherence tomography systems,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 8, S. 902–917, 2017.
- [85] J. F. de Boer, B. Cense, B. H. Park, M. C. Pierce, G. J. Tearney, und B. E. Bouma, “Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time domain optical coherence tomography,” *Optics Letters*, Vol. 28, S. 2067–2069, 2003.
- [86] M. Maria, I. B. Gonzalo, M. Bondu, R. D. Engelsholm, T. Feuchter, P. M. Moselund, L. Leick, O. Bang, und A. Podoleanu, “A comparative study of noise in supercontinuum light sources for ultra-high resolution optical coherence tomography,” *Proc. of SPIE*, Vol. 10056, 2017.
- [87] H. Naumann, G. Schröder, und M. Löffler-Mang, *Handbuch Bauelemente der Optik*. Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, 2014.
- [88] Thorlabs GmbH, “ScienceDesk workstation breadboard specifications.” Bedienungsanleitung, 2016.
- [89] Grintech GmbH, “GRIN Needle Endomicroscopes.” Datenblatt, 2013.
- [90] A. H. Bachmann, M. L. Villiger, C. Blatter, T. Lasser, und R. A. Leitgeb, “Resonant Doppler flow imaging and optical vivisection of retinal blood vessels,” *Optics Express*, Vol. 15, S. 408–422, 2007.
- [91] Thorlabs GmbH, “ThorImage OCT operation manual Vers. 4.4.” Bedienungsanleitung, 2016.
- [92] F. J. Harris, “On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform,” *Proceedings of the IEEE*, Vol. 66, S. 51–83, 1978.
- [93] Mathworks Inc., “Matlab interpolation.”
- [94] D. Hillmann, *Holoscapy*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2013.
- [95] C. E. Shannon, “A mathematical theory of communication,” *The Bell System Technical Journal*, Vol. 27, S. 3, 1948.
- [96] W. Riehemann, “Persönliches gespräch,” 2018.
- [97] W. J. Brown, S. Kim, und A. Wax, “Noise characterization of supercontinuum sources for low-coherence interferometry applications,” *Journal of the Optical Society of America A*, Vol. 31, S. 2703–2710, 2014.
- [98] M. Mall, B. R. Grubb, J. R. Harkema, W. K. O’Neal, und R. C. Boucher, “Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice,” *Nature Medicine*, Vol. 10, S. 487–493, 2004.

- [99] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, "Fiji: An open-source platform for biological-image analysis," *Nature Methods*, Vol. 9, S. 676–682, 2012.
- [100] C. Myrtus, *Evaluation der Optischen Kohärenzmikroskopie zur strukturellen und funktionellen Analyse von Bronchialgewebe*. Masterarbeit, Universität zu Lübeck, 2013.
- [101] W. R. Buckett, C. E. Marjoribanks, F. A. Marwick, und M. B. Morton, "The pharmacology of pancuronium bromide (Org.NA97), a new potent steroidal neuromuscular blocking agent," *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, Vol. 32, S. 671–82, 1968.
- [102] P. Thévenaz, U. E. Ruttimann, und M. Unser, "A pyramid approach to subpixel registration based on intensity," *IEEE Transactions on Image Processing*, Vol. 7, S. 27–41, 1998.
- [103] H. Schulz-Hildebrandt, M. Pieper, C. Stehmar, M. Ahrens, C. Idel, B. Wollenberg, P. König, und G. Hüttmann, "Novel endoscope with increased depth of field for imaging human nasal tissue by microscopic optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, Vol. 9, S. 636–647, 2018.
- [104] R. A. Niesner, V. Andresen, und M. Gunzer, "Intravital two-photon microscopy: Focus on speed and time resolved imaging modalities," *Immunological Reviews*, Vol. 221, S. 7–25, 2008.
- [105] S. Chen, X. Liu, N. Wang, X. Wang, Q. Xiong, E. Bo, X. Yu, S. Chen, und L. Liu, "Visualizing micro-anatomical structures of the posterior cornea with micro-optical coherence tomography," *Scientific Reports*, Vol. 7, S. 1–10, 2017.
- [106] C. W. Merkle, S. P. Chong, A. M. Kho, J. Zhu, A. Dubra, und V. J. Srinivasan, "Visible light optical coherence microscopy of the brain with isotropic femtoliter resolution in vivo," *Optics Letters*, Vol. 43, S. 198–201, 2018.
- [107] S. Tamborski, H. C. Lyu, H. Dolezyczek, M. Malinowska, G. Wilczynski, D. Szlag, T. Lasser, M. Wojtkowski, und M. Szkulmowski, "Extended-focus optical coherence microscopy for high-resolution imaging of the murine brain," *Biomedical Optics Express*, Vol. 7, S. 4400–4414, 2016.
- [108] A. Alex, A. Li, X. Zeng, R. E. Tate, M. L. McKee, D. E. Capen, Z. Zhang, R. E. Tanzi, und C. Zhou, "A circadian clock gene, cry, affects heart morphogenesis and function in *Drosophila* as revealed by optical coherence microscopy," *PLoS ONE*, Vol. 10, S. 1–17, 2015.
- [109] J. Men, J. Jerwick, P. Wu, M. Chen, A. Alex, Y. Ma, R. E. Tanzi, A. Li, und C. Zhou, "Drosophila preparation and longitudinal imaging of heart function in vivo using optical coherence microscopy (OCM)," *Journal of Visualized Experiments*, Vol. 118, S. 1–25, 2016.
- [110] J. Horstmann, H. Schulz-Hildebrandt, F. Bock, S. Siebelmann, E. Lankenau, G. Hüttmann, P. Steven, und C. Cursiefen, "Label-free in vivo imaging of corneal lymphatic vessels using microscopic optical coherence tomography," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 58, S. 5880–5886, 2017.
- [111] K.-S. Lee, H. Zhao, S. F. Ibrahim, N. Meemon, L. Khoudeir, und J. P. Rolland, "Three-dimensional imaging of normal skin and nonmelanoma skin cancer with cellular resolution using Gabor domain optical coherence microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 17, S. 1–8, 2012.
- [112] A. Cogliati, C. Canavesi, A. Hayes, P. Tankam, V.-F. Duma, A. Santhanam, K. P. Thompson, und J. P. Rolland, "MEMS-based handheld scanning probe with pre-shaped input signals for distortion-free images in Gabor-domain optical coherence microscopy," *Optics Express*, Vol. 24, S. 13365–13374, 2016.
- [113] D. Lorensen, C. Christian Singe, A. Curatolo, und D. D. Sampson, "Energy-efficient low-Fresnel-number Bessel beams and their application in optical coherence tomography," *Optics Letters*, Vol. 39, S. 548–551, 2014.
- [114] Q. Fang, A. Curatolo, P. Wijesinghe, Y. L. Yeow, J. Hamzah, P. B. Noble, K. Karnowski, D. D. Sampson, R. Ganss, J. K. Kim, W. M. Lee, und B. F. Kennedy, "Ultrahigh-resolution optical coherence elastography through a micro-endoscope: towards in vivo imaging of cellular-scale

- mechanics,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 8, S. 5127–5138, 2017.
- [115] R. Yadav, K.-S. Lee, J. P. Rolland, J. M. Zavislan, J. V. Aquavella, und G. Yoon, “Micrometer axial resolution OCT for corneal imaging,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 2, S. 3037–3046, 2011.
- [116] J. Czajkowski, J. Lauri, R. Sliz, P. Fält, T. Fabritius, R. Myllylä, und B. Cense, “Sub-micron resolution, high-speed spectral domain optical coherence tomography in quality inspection for printed electronics,” in *Proc. SPIE*, Vol. 8430, 2012.
- [117] C. W. Merkle, S. P. Chong, A. M. Kho, J. Zhu, A. Dubra, und V. J. Srinivasan, “Visible light optical coherence microscopy of the brain with isotropic femtoliter resolution in vivo,” *Optics Letters*, Vol. 43, S. 198–201, 2018.
- [118] D. Hillmann, H. Spahr, C. Hain, H. Sudkamp, G. Franke, C. Pfäffle, C. Winter, und G. Hüttmann, “Aberration-free volumetric high-speed imaging of in vivo retina,” *Scientific Reports*, Vol. 6, 2016.
- [119] J. Barrick, A. Doblas, M. R. Gardner, P. R. Sears, L. E. Ostrowski, und A. L. Oldenburg, “High-speed and high-sensitivity parallel spectral-domain optical coherence tomography using a supercontinuum light source,” *Opt. Lett.*, Vol. 41, S. 5620–5623, 2016.
- [120] M. R. Knowles und R. C. Boucher, “Innate defenses in the lung,” *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 109, S. 571–577, 2002.
- [121] J. Hussong, R. Lindken, P. Faulhammer, K. Noreikat, K. V. Sharp, W. Kummer, und J. Westerweel, “Cilia-driven particle and fluid transport over mucus-free mice tracheae,” *Journal of Biomechanics*, Vol. 46, S. 593–598, 2013.
- [122] K. Amersbach, G. Bayer, A. Bethe, A. Brunner, W. Felix, und F. Flury, *Atmung: Aufnahme und Abgabe Gasförmiger Stoffe*. Springer Verlag, 1925.
- [123] L. Chen, K. Lai, J. M. Lomask, B. Jiang, und N. Zhong, “Detection of mouse cough based on sound monitoring and respiratory airflow waveforms,” *PLoS ONE*, Vol. 8, 2013.
- [124] L. W. Locke, M. M. Myerburg, M. R. Markovetz, R. S. Parker, L. Weber, M. R. Czachowski, T. J. Harding, S. L. Brown, J. A. Nero, J. M. Pilewski, und T. E. Corcoran, “Quantitative imaging of airway liquid absorption in cystic fibrosis,” *European Respiratory Journal*, Vol. 44, S. 675–684, 2014.
- [125] T. M. Chen und M. J. Dulfano, “Mucus viscoelasticity and mucociliary transport rate,” *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. 91, S. 423–31, 1978.
- [126] C. H. Feng, M. D. Miller, und R. A. Simon, “The united allergic airway: Connections between allergic rhinitis, asthma, and chronic sinusitis,” *American Journal of Rhinology and Allergy*, Vol. 26, S. 187–190, 2012.
- [127] K. Aanæs, “Bacterial sinusitis can be a focus for initial lung colonisation and chronic lung infection in patients with cystic fibrosis,” *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol. 12, 2013.
- [128] E. A. Illing und B. A. Woodworth, “Management of the upper airway in cystic fibrosis,” *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, Vol. 20, S. 623–631, 2014.
- [129] U. Oltmanns, K. Palmowski, M. Wielpütz, N. Kahn, E. Baroke, R. Eberhardt, S. Wege, M. Wiebel, M. Kreuter, F. J. Herth, und M. A. Mall, “Optical coherence tomography detects structural abnormalities of the nasal mucosa in patients with cystic fibrosis,” *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol. 15, S. 216–222, 2016.
- [130] D. Cui, K. K. Chu, B. Yin, T. N. Ford, C. Hyun, H. M. Leung, J. A. Gardecki, G. M. Solomon, S. E. Birket, L. Liu, S. M. Rowe, und G. J. Tearney, “Flexible, high-resolution micro-optical coherence tomography endobronchial probe toward in vivo imaging of cilia,” *Optics Letters*, Vol. 42, S. 867–870, 2017.
- [131] P. Mouroulis, “Depth of field extension with spherical optics,” *Optics Express*, Vol. 16, S. 12995–13004, 2008.
- [132] R. C. Bakaraju, K. Ehrmann, E. B. Papas, und A. Ho, “Depth-of-focus and its association with the spherical aberration sign. A ray-tracing analysis,” *Journal of Optometry*, Vol. 3,

- S. 51–59, 2010.
- [133] W.-C. Kuo, C.-M. Lai, Y.-S. Huang, C.-Y. Chang, und Y.-M. Kuo, “Balanced detection for spectral domain optical coherence tomography,” *Optics Express*, Vol. 21, S. 19280–19291, 2013.
- [134] T. Klein, W. Wieser, L. Reznicek, A. Neubauer, A. Kampik, und R. Huber, “Multi-MHz retinal OCT,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 4, S. 1890–1908, 2013.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Gegenüberstellung der axialen und lateralen Auflösung (OCT/RCM)	5
1.2	mOCT Aufnahme einer murinen Schilddrüse zur Demonstration des konfokalen Gatings	6
2.1	Anatomie des respiratorischen Systems	10
2.2	Histologie der Trachea (Maus)	12
3.1	Schematische Aufbauskinne mOCT	29
3.2	Spektrale Leistungsdichteverteilung des Superkontinuum-Lasers . . .	30
3.3	Optomechanischer Aufbau des mOCTs	31
3.4	mOCT-Aufbau für die Kleintierbildgebung	32
3.5	Schematische Aufbauskinne für die emOCT	33
3.6	Optisches Endoskopdesign für die emOCT	34
3.7	emOCT-Endoskop	34
3.8	Verschaltungsplan des mOCT-Aufbaus	35
3.9	Bedienoberfläche der ThorImage Software	36
3.10	Bedienoberfläche des Programms zur Datenakquisition	37
3.11	Bedienoberfläche des Programms zur Datenprozessierung	37
3.12	Bedienoberfläche des Programms zu Bestimmung der Dispersionskoeffizienten	40
3.13	Bestimmung des Dynamikumfangs und der Sensitivität	42
3.14	Bestimmung des maximalen Bildfeldes	43
3.15	Laterale Auflösung mOCT	44
3.16	Einfluss der Dispersionskorrektur auf die axiale Auflösung	46
3.17	Erläuterung zur Simulation der mOCT-Bildgebung	47
3.18	Versuchsaufbau zur Darstellung von Trachealgewebe	49
3.19	Versuchsaufbau für die Zilienschlag Messung an der Trachea	50
3.20	Methode zur Bestimmung der Zilienschlagfrequenz	51
4.1	Morphologische Darstellung der Trachea <i>ex vivo</i>	56
4.2	Gemittelte Zeitserie und frequenzanalyzierter B-Scan, gemessen an einer offenen und geschlossenen Trachea	59
4.3	Messung der Zilienschlagfrequenz an der mit Luft gefüllte Trachea .	61
4.4	mOCT-Darstellung der oberen Trachealwand	62
4.5	Messung der Zilienschlagfrequenz an der Maus nach Blockade der Atmung.	62
4.6	Quantifizierung der Transportmechanismen (Aspiration/ Exhalation)	63

4.9	Messung der Blockierung der Trachea durch Mukus mit OCT	65
4.7	Response der WT-Tiere auf 0,9% NaCl bzw. 7,0% NaCl	66
4.8	Response der β -ENaC-Tiere auf 0,9% NaCl bzw. 7,0% NaCl	67
4.10	Erläuterung zur quantifizierenden Auswertung der Tierstudie	68
4.11	Quantitativer Vergleich der zeitlichen Veränderung der ASL-Dicke nach Anwendung von isotoner und hypertoner Kochsalzlösung in WT- und β ENaC-Mäusen	69
4.12	Gemessene Aberrationen in dem emOCT-Endoskop	71
4.13	Gemessene Auflösungen für das emOCT-Endoskop	72
4.14	Simulation der mOCT-Bildgebung ohne und mit Aberrationen.	73
4.15	<i>Ex vivo</i> emOCT Messungen an Gewebe der Concha nasalis media	75
4.16	Vergleichs Messungen der OCT mit der emOCT in der Nase	76
4.17	emOCT Messung in der Nase eines Probanden	77
4.18	Quantifizierung des Schleimtransports in der menschlichen Nase <i>in vivo</i>	78

A Anhang

Anhang A

A.1 Visualisierungen

A.1.1 Visualisierung zu Abschnitt 4.1.1.2

Visualisierung zu Abbildung 4.3

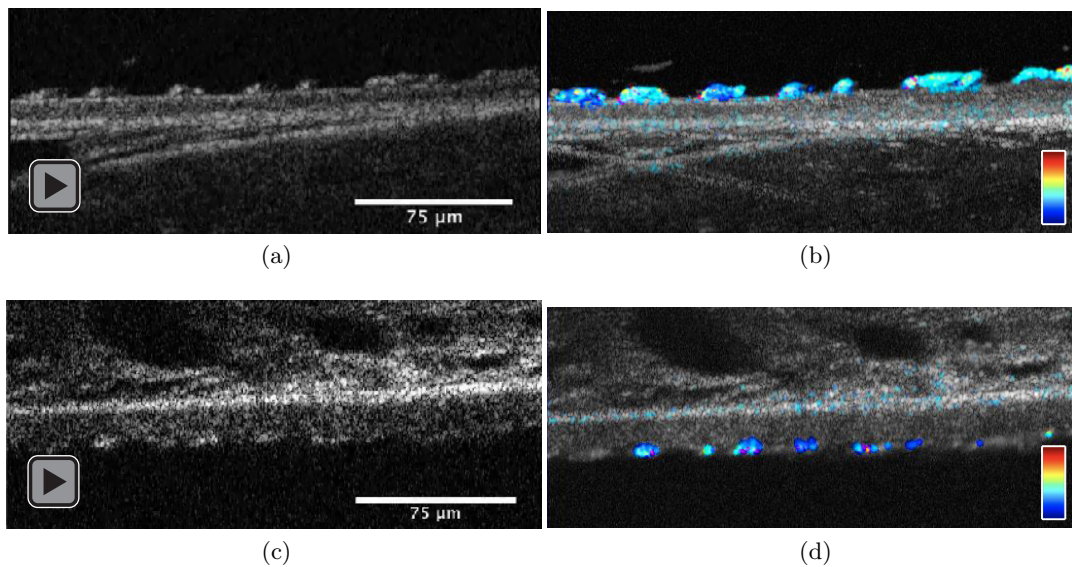


Abbildung A.1: Messungen von Zilienbewegung an einer offenen und geschlossenen Trachea. a) Zeitserie über 200 B-Scans an der offenen Trachea von der Seite des Epithels gemessen. b) Farbcodierte Darstellung der dominierenden Frequenz. c) Zeitserie über 200 B-Scans von Zilienbewegung durch die Wand einer geschlossenen Trachea, deren Inneres mit Flüssigkeit gefüllt war. d) Farbcodierte Darstellung der dominierenden Frequenz.

Visualisierung zu Abbildung 4.4

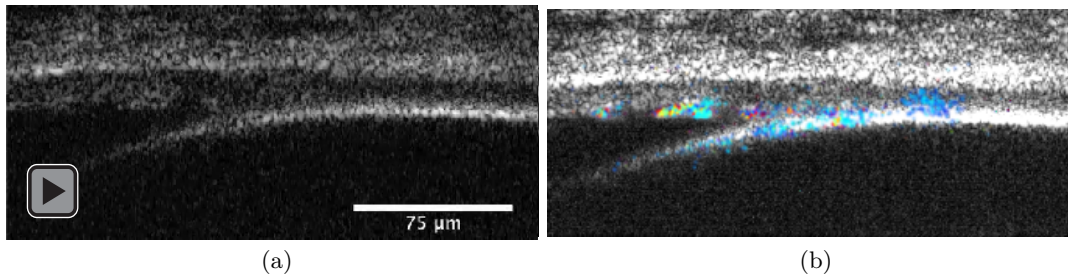


Abbildung A.2: Zeitserie über 100 Bildern vom Übergang zwischen Flüssigkeit und Luftblase (a) mit zugehöriger Frequenzanalyse (b). Die Messung erfolgte durch die Trachealwand in das teilweise mit Luft gefüllte Lumen.

Visualisierung zu Abbildung 4.6

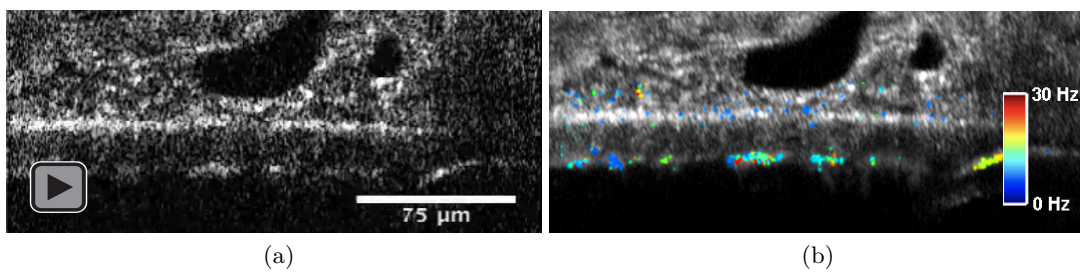


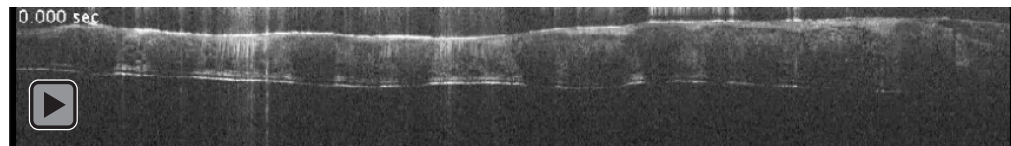
Abbildung A.3: Messung der Zilienschlagfrequenz in der lebenden Maus nach Blockade der Atmung. Gemittelte Zeitserie über 100 B-Scans von Zilienbewegung durch die Wand einer intakten Trachea. a) Die Speckelstruktur ist an den Orten der Zilienbüschel nicht mehr erkennbar. b) Farbcodierte Darstellung der dominierenden Frequenzen.

A.1.2 Visualisierung zu Abschnitt 4.1.1.2

Visualisierung zu Abbildung 4.8



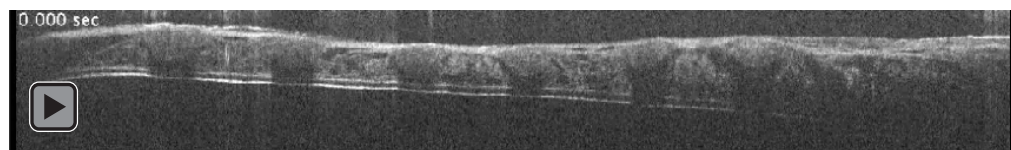
(a)



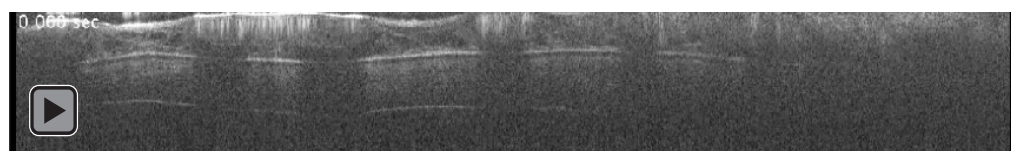
(b)

Abbildung A.4: Repräsentative Zeitserie von B-Scans, die den charakteristischen Mukustransport anhand je eines der untersuchten WT-Tiere nach Gabe von isotoner Kochsalzlösung (a) bzw. hypertoner Kochsalzlösung (b) zeigt.

Visualisierung zu Abbildung 4.9



(a)



(b)

Abbildung A.5: Repräsentative Zeitserie von B-Scans, die den charakteristischen Mukustransport anhand je eines der untersuchten β -ENaC-Tiere nach Gabe von isotoner Kochsalzlösung (a) bzw. hypertoner Kochsalzlösung (b) zeigt.

Visualisierung zu Abbildung 4.10

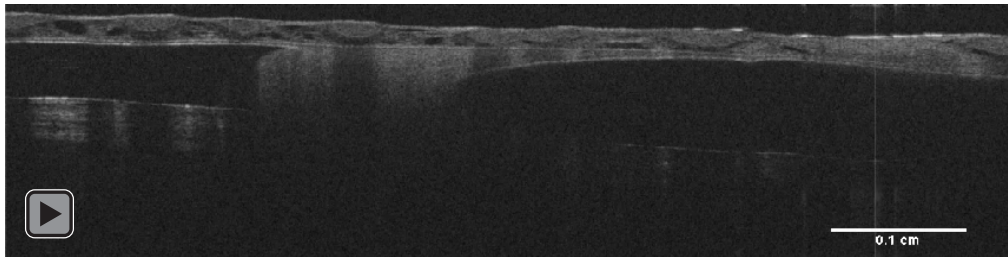


Abbildung A.6: OCT-Aufnahme nach der Gabe von isotoner Kochsalzlösung zeigt eine Blockade über den vollen Querschnitt der Trachea durch Mukus.

A.1.3 Visualisierung zu Abschnitt 4.1.1.2

Visualisierung zu Abbildung 4.16

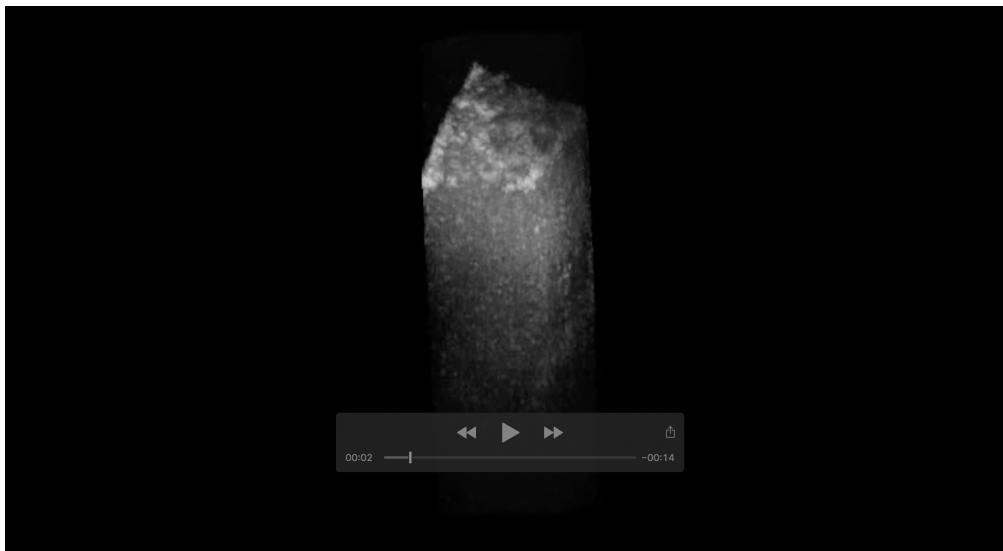


Abbildung A.7: *Ex vivo* Messung an Gewebe der *Concha nasalis media*. Volumenaufnahmen des Zilien tragenden Epithels mit einer Geschwindigkeit von zwei Volumen pro Sekunde.

Visualisierung zu Abbildung 4.18

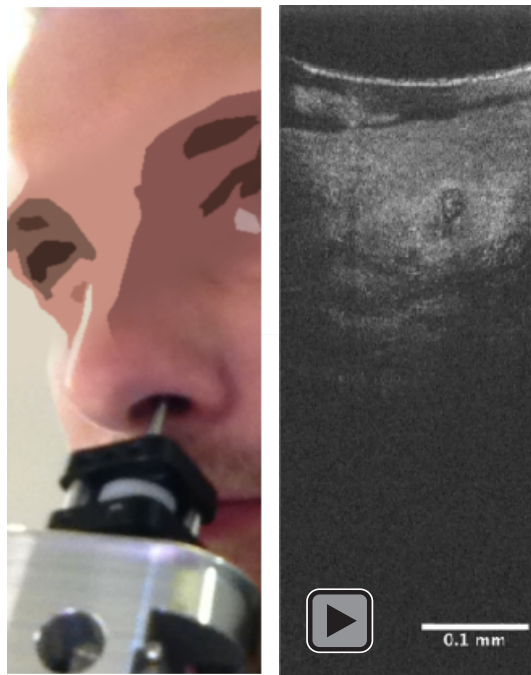


Abbildung A.8: *In vivo* emOCT Messung in der Nase eines Probanden. Dynamische Vorgänge auf zellulärer Ebene wie z. B. der Fluss einzelner Blutzellen ist deutlich zu erkennen.

Visualisierung zu Abbildung 4.19

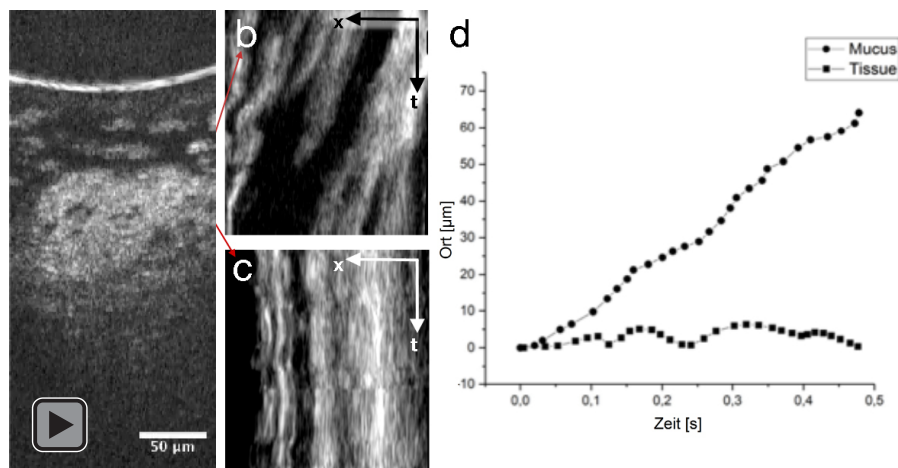


Abbildung A.9: Quantifizierung des Schleimtransports in der menschlichen Nase *in vivo*. a) Eine Zeitserie zeigt die Bewegung des Mucus über dem Epithel. b) Extrahierte Signale aus der Zeitserie entlang der x-Achse in der Tiefe des Mucus. c) Orts-Zeit-Darstellung für eine Schicht im Gewebe. d) Auswertung von Bewegung markanter Strukturen. Aus diesen Daten wurde die laterale Bewegung in beiden Schichten berechnet.

A.2 Einzelauswertung CF-Studie

Eine quantitative Auswertung der Messdaten erfolgte durch die Bestimmung der Veränderung der ASL, die in jedem 60. B-Scan der Zeitserie durchgeführt wurde. Da die ASL nicht direkt bestimmt werden konnte, wurde der Abstand zwischen der stark streuenden *Lamina propria* und der stark reflektierenden Luft-Flüssigkeits-Grenze mit der OpenSource Software Fiji gemessen. Die Messwerte sind als Mittelwert angegeben mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Statistische Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem einseitigen Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um die Überlegenheit der Behandlung gegenüber der Kontrolle zu ermitteln (0,9 %ige NaCl-Lösung). Dabei wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Im Folgenden ist die Zusammenfassung der Auswertung für jedes einzelne Tier tabellarisch dargestellt.

β-ENaC Mäuse mit Applikation von 0,9% NaCl

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
09.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#M7872)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7872/5_+/tg	m	15.09.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
30548/1	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
Pixelabstand				Brechungsindex			
7e-7 µm				1,33			
Epithelhöhe (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Div. Punkte	20	25,2	(0,7)	18,7	31,8		
ASL + Epithel vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	60	26,3	(0,2)	22,4	29,4	-	-
Punkt 1	60	27,4	(0,2)	24,6	32,3		
Punkt 2	60	26,7	(0,2)	24,6	31,0		
Punkt 3	60	28,6	(0,2)	25,3	31,6		
Alle Punkte	240	27,3	o	24,3	31,1	o	o
ASL Änderung nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	29,6	(3,2)	3,2	116,0	7,9e-2	(4,4e-3)
Punkt 1	61	69,6	(3,1)	8,6	127,1		
Punkt 2	61	95,6	(2,3)	43,0	138,0		
Punkt 3	61	102,6	(2,9)	9,2	153,9		
Alle Punkte	244	74,4	o	16,0	133,7	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
12.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#M7889)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7889/2_+/tg	m	21.09.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
30541/1	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Div. Punkte	20	24,8	(0,6)	19,1	29,1		
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	5	25,4	(0,8)	22,8	27,4	-	-
Punkt 1	5	25,7	(0,8)	23,2	27,4		
Punkt 2	5	27,8	(0,7)	26,1	30,0		
Punkt 3	5	25,1	(0,9)	22,6	28,21		
Alle Punkte	20	26,0	o	22,8	30,0	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	64,0	(6,2)	16,5	258,6	9,0e-2	(8,1e-3)
Punkt 1	61	71,6	(7,3)	17,5	267,6		
Punkt 2	61	83,9	(8,1)	18,2	251,8		
Punkt 3	61	101,2	(9,0)	17,6	238,3		
Alle Punkte	244	80,4	o	16,5	267,6	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
12.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#M7890)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7890	m	21.09.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
30541/2	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Div. Punkte	20	27,9	(0,7)	20,0	36,6		
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	5	29,4	(0,4)	28,4	30,5	-	-
Punkt 1	5	28,0	(0,3)	27,4	28,9		
Punkt 2	5	27,4	(0,3)	26,3	28,0		
Punkt 3	5	28,8	(0,5)	27,5	30,0		
Alle Punkte	20	28,4	o	26,3	30,5	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	62,6	(4,7)	17,6	179,7	5,8e-2	(4,9e-3)
Punkt 1	61	65,0	(5,1)	20,9	207,5		
Punkt 2	61	73,0	(6,1)	16,3	205,6		
Punkt 3	61	99,9	(5,5)	18,3	175,7		
Alle Punkte	244	47,2	o	16,3	297,5	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
26.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#ID31057)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
LR	f	07.10.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
31057	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Div. Punkte	20	20,1	(0,3)	16,6	21,7		
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	5	25,4	(0,3)	24,6	26,0	-	-
Punkt 1	5	24,7	(0,6)	23,9	26,7		
Punkt 2	5	25,3	(0,5)	23,9	26,7		
Punkt 3	5	26,7	(0,5)	23,9	28,8		
Alle Punkte	-20	25,5	o	23,9	28,8	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	48	37,4	(5,9)	19,0	212,0	1,3e-1	(9,3e-3)
Punkt 1	48	79,3	(10,9)	14,0	229,5		
Punkt 2	48	93,9	(10,8)	13,3	232,6		
Punkt 3	48	109,0	(11,4)	14,0	274,4		
Alle Punkte	192	79,9	o	13,3	274,4	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
01.12.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#ID31056)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
	f	07.10.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
31056	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Div. Punkte	20	27,1	(0,6)	27,1	30,9		
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	4	32,3	(1,0)	30,5	34,2	-	-
Punkt 1	4	28,5	(0,4)	27,4	29,4		
Punkt 2	4	29,8	(0,3)	28,9	30,5		
Punkt 3	4	30,7	(0,9)	29,9	32,6		
Alle Punkte	16	30,3	o	27,4	34,2	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	88,7	(8,1)	19,7	260,4	3,4e-2	(6,7e-3)
Punkt 1	61	82,5	(7,4)	18,2	249,1		
Punkt 2	61	83,8	(8,7)	18,9	327,7		
Punkt 3	61	96,2	(7,6)	20,5	240,0		
Alle Punkte	244	87,8	0	18,2	327,7	o	o

β-ENaC Mäuse mit Applikation von 7% NaCl

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
03.09.2015	0,5 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#M497)*							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7497				C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	5	29,1	(0,6)	29,5	30,9	-	-
Punkt 1	5	29,1	(0,7)	28,8	30,9		
Punkt 2	5	29,0	(0,6)	28,8	31,2		
Punkt 3	5	26,7	(0,6)	26,7	28,8		
Alle Punkte	20	28,5	o	26,7	31,2	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	63,0	(2,2)	39,1	59,0	3,6e-3	(4,0e-4)
Punkt 1	61	59,7	(2,5)	29,5	57,2		
Punkt 2	61	75,2	(4,3)	34,4	65,3		
Punkt 3	61	69,5	(3,3)	38,3	64,3		
Alle Punkte	244	66,9	o	29,5	65,3	o	o

*Diese Maus wurde als Einzige mit einer höheren Vergrößerung aufgenommen.

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
13.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#M7914)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7914/1_+/tg	f	25.09.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	AktENZEICHEN					
30542/1	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	60	24,1	(0,2)	21,8	26,7	-	-
Punkt 1	60	26,3	(0,2)	23,9	29,5		
Punkt 2	60	25,1	(0,2)	21,8	30,2		
Punkt 3	60	27,0	(0,2)	23,2	30,2		
Alle Punkte	240	25,6	o	21,8	30,2	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	61	99,8	(4,8)	32,7	185,3	5,0e-2	(5,0e-3)
Punkt 1	61	105,8	(5,4)	41,1	247,4		
Punkt 2	61	136,2	(4,9)	55,9	276,8		
Punkt 3	61	159,7	(5,1)	105,3	308,4		
Alle Punkte	244	125,4	o	32,7	308,4	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
25.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#ID31061)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
RR	m	07.10.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
31061	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	60	26,6	(0,2)	23,2	30,2	-	-
Punkt 1	60	25,8	(0,1)	22,5	27,4		
Punkt 2	60	24,3	(0,1)	21,1	27,4		
Punkt 3	60	23,8	(0,2)	22,3	26,7		
Alle Punkte	240	25,1	o	21,1	30,2	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	120,1	(7,9)	17,6	221,8	4,2e-2	(4,9e-3)
Punkt 1	61	126,0	(6,9)	18,5	220,1		
Punkt 2	61	127,0	(6,6)	20,4	227,4		
Punkt 3	61	139,8	(7,1)	22,5	278,6		
Alle Punkte	244	107,7	o	17,6	278,6	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
02.12.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#ID31054)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
R	f	07.10.2015		C57BL/6		β-ENaC	
Batch	Lieferant	AktENZEICHEN					
31054	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	8	26,4	(0,5)	23,9	28,1	-	-
Punkt 1	8	28,4	(0,7)	25,3	31,6		
Punkt 2	8	27,0	(0,6)	24,6	29,5		
Punkt 3	8	29,1	(0,6)	27,4	31,6		
Alle Punkte	32	27,7	o	23,9	31,6	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	61	103,5	(5,3)	27,9	240,0	3,9e-2	3,6e-3
Punkt 1	61	124,5	(5,5)	33,7	295,5		
Punkt 2	61	124,8	(7,2)	23,9	279,3		
Punkt 3	61	137,6	(5,9)	24,6	240,3		
Alle Punkte	244	102,1	o	24,6	295,5	o	o

Experiment								
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher		
20.01.2016	0,16 NA	Ja		Ja		Ja		
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl						
Maus (#ID33593)								
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art		
LRR	f	03.12.2015		C57BL/6		β-ENaC		
Batch	Lieferant	Aktenzeichen						
33593	IBF	1 (106-9/14)_Pieper						
Ergebnis								
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung								
				Pixelabstand		Brechungsindex		
				7e-7 µm		1,33		
Epithelhöhe								
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.			
Keine Werte vorhanden								
Mukusdicke vor Stimulation (µm)								
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	5	26,4	(0,2)	26,0	27,0	-	-	
Punkt 1	5	27,0	(0,9)	24,6	28,4			
Punkt 2	5	24,9	(0,6)	23,0	26,3			
Punkt 3	5	26,7	(0,4)	25,5	27,5			
Alle Punkte	20	26,2	o	23,0	28,4	o	o	
Mukusdicke nach Stimulation (µm)								
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	83,7	(3,5)	31,7	194,5	5,4e-2	3,3e-3	
Punkt 1	61	83,9	(4,1)	23,5	204,0			
Punkt 2	61	112,5	(4,8)	28,1	234,8			
Punkt 3	61	146,4	(5,2)	27,4	292,0			
Alle Punkte	244	100,5	o	23,5	194,5	o	o	

WT-Mäuse mit Applikation von 0,9 % NaCl

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
09.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#M7873)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7873/6_+/+	m	15.09.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
30538/2	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	60	20,1	(0,1)	16,8	22,5	-	-
Punkt 1	60	19,3	(0,2)	15,5	23,9		
Punkt 2	60	21,6	(0,1)	19,6	24,6		
Punkt 3	60	21,6	(0,2)	17,6	26,7		
Alle Punkte	240	20,6	o	15,5	22,5	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	61	27,1	(0,6)	18,9	40,7	1,5e-2	(8,2e-4)
Punkt 1	61	21,1	(0,2)	18,3	24,6		
Punkt 2	61	24,1	(0,1)	21,8	26,7		
Punkt 3	61	27,1	(0,2)	22,5	31,6		
Alle Punkte	244	24,98	o	18,3	31,6	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
01.12.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#ID31059)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
R	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	AktENZEICHEN					
31059	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	60	34,9	(0,2)	32,3	39,3	-	-
Punkt 1	60	27,8	(0,2)	25,3	32,3		
Punkt 2	60	19,8	(0,2)	16,1	23,2		
Punkt 3	60	25,1	(0,2)	22,5	29,5		
Alle Punkte	240	26,9	o	16,1	39,3	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	35,8	(0,3)	31,6	44,2	4,0e-2	(8,7e-4)
Punkt 1	61	25,1	(0,3)	21,8	30,9		
Punkt 2	61	19,4	(0,2)	16,8	32,2		
Punkt 3	61	23,2	(0,3)	20,4	29,5		
Alle Punkte	244	25,9	o	16,8	44,2	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
03.12.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#ID31052)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
L	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
31052	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
				Pixelabstand		Brechungsindex	
				7e-7 µm		1,33	
Epithelhöhe (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	10	19,9	(0,3)	19,0	21,8	-	-
Punkt 1	10	22,3	(0,4)	20,4	23,9		
Punkt 2	10	20,8	(0,5)	18,4	22,5		
Punkt 3	10	20,7	(0,4)	18,9	22,5		
Alle Punkte	40	20,9	o	19,0	23,9	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)
Punkt 0	61	18,4	(0,2)	15,5	25,3	9,6e-3	1,4e-3
Punkt 1	61	18,9	(0,2)	15,7	23,2		
Punkt 2	61	17,6	(0,3)	13,8	23,9		
Punkt 3	61	20,3	(0,7)	14,2	38,2		
Alle Punkte	244	18,8	o	13,8	38,2	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
03.12.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#ID31053)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
LR	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	AktENZEICHEN					
31053	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	4	20,7	(1,4)	18,3	24,6	-	-
Punkt 1	4	20,2	(0,8)	18,2	21,8		
Punkt 2	4	22,8	(1,6)	18,9	26,0		
Punkt 3	4	23,2	(1,5)	20,4	27,5		
Alle Punkte	16	21,7	o	18,2	27,5	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	20,5	(0,2)	16,2	26,7	1,2e-2	8,6e-4
Punkt 1	61	22,1	(0,2)	19,7	30,9		
Punkt 2	61	26,2	(0,3)	22,5	34,4		
Punkt 3	61	22,3	(0,3)	18,9	30,9		
Alle Punkte	244	22,9	o	16,2	34,3	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
03.03.2016	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 0,9% NaCl					
Maus (#ID31053)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
LR	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
33591	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	10	35,4	(0,6)	31,6	37,9	-	-
Punkt 1	10	23,0	(0,6)	20,4	26,0		
Punkt 2	10	24,2	(0,5)	22,5	26,7		
Punkt 3	10	21,5	(0,6)	18,3	25,3		
Alle Punkte	40	26,0	o	18,3	37,9	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	14,7	(0,2)	11,8	19,2	2,5e-2	(1,1e-3)
Punkt 1	61	20,7	(0,4)	14,8	30,3		
Punkt 2	61	21,7	(0,2)	16,9	26,0		
Punkt 3	61	20,8	(0,2)	13,3	23,9		
Alle Punkte	244	19,5	o	11,8	30,3	o	o

WT-Mäuse mit Applikation von 7 % NaCl

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
13.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#M7915)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
7915/2_+/+	f	25.09.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
30542/2	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	56	21,5	(0,2)	18,9	24,6	-	-
Punkt 1	56	21,0	(0,2)	17,6	24,6		
Punkt 2	56	18,7	(0,2)	15,4	21,1		
Punkt 3	56	19,9	(0,2)	16,1	23,2		
Alle Punkte	224	20,3	o	15,4	24,6	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	19,1	(0,2)	14,0	22,5	1,2e-2	(9,6e-4)
Punkt 1	61	17,8	(0,1)	15,4	20,4		
Punkt 2	61	19,2	(0,2)	15,4	23,2		
Punkt 3	61	16,0	(0,2)	11,0	21,1		
Alle Punkte	244	18,0	o	11,9	23,2	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
24.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#ID31062)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
-	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	AktENZEICHEN					
31062	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	54	18,7	(0,2)	16,1	21,8	-	-
Punkt 1	54	19,5	(0,2)	16,1	22,5		
Punkt 2	54	19,3	(0,2)	16,8	23,2		
Punkt 3	54	17,9	(0,2)	13,4	21,1		
Alle Punkte	216	18,8	o	13,4	23,2	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	18,7	(0,2)	14,8	21,9	6,5e-3	(9,5e-4)
Punkt 1	61	18,6	(0,3)	14,8	22,5		
Punkt 2	61	18,0	(0,2)	14,7	23,2		
Punkt 3	61	18,3	(0,3)	13,3	30,2		
Alle Punkte	244	18,4	o	13,3	30,2	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
27.11.2015	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#ID31060)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
LLR	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
31060	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	10	20,8	(0,3)	19,0	21,8	-	-
Punkt 1	10	22,8	(0,4)	19,7	24,6		
Punkt 2	10	24,7	(0,4)	23,2	26,7		
Punkt 3	10	23,0	(0,6)	20,4	27,4		
Alle Punkte	40	22,8	o	19,0	27,4	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	17,9	(0,2)	15,4	21,8	3,8e-2	(6,2e-3)
Punkt 1	61	18,3	(0,6)	14,0	45,6		
Punkt 2	61	29,2	(2,5)	18,3	113,3		
Punkt 3	61	28,0	(3,0)	14,8	130,5		
Alle Punkte	244	23,4	o	14,0	130,5	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
04.12.2016	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#ID31051)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
R	f	07.10.2015		C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	AktENZEICHEN					
31051	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
		Pixelabstand			Brechungsindex		
		7e-7 µm			1,33		
Epithelhöhe (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	10	24,9	(0,4)	22,5	26,7	-	-
Punkt 1	10	24,6	(0,5)	21,8	26,9		
Punkt 2	10	23,1	(0,5)	21,1	26,0		
Punkt 3	10	24,0	(0,4)	22,5	26,7		
Alle Punkte	40	24,2	o	21,1	26,9	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
		N	Mittelwert (SE)	Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	24,5	(0,4)	16,1	30,2	2,2e-2	(1,2e-3)
Punkt 1	61	18,5	(0,2)	14,8	24,6		
Punkt 2	61	17,9	(0,3)	14,0	27,4		
Punkt 3	61	20,8	(0,6)	14,1	42,1		
Alle Punkte	244	20,4	o	14,0	42,1	o	o

Experiment							
Datum	Obektiv	Vorher		Während		Nachher	
03.03.2016	0,16 NA	Ja		Ja		Ja	
Challenge		Nasale Applikation von 30 µl 7% NaCl					
Maus (#ID33590)							
Kennzeichnung	Sexicon	Geb.		Stamm		Art	
				C57BL/6		WT	
Batch	Lieferant	Aktenzeichen					
	IBF	1 (106-9/14)_Pieper					
Ergebnis							
Verwendete Konstanzen bei der Auswertung							
	Pixelabstand			Brechungsindex			
	7e-7 µm			1,33			
Epithelhöhe (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.		
Keine Werte vorhanden							
Mukusdicke vor Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	10	19,7	(0,4)	18,2	21,8	-	-
Punkt 1	10	18,8	(0,3)	17,0	21,1		
Punkt 2	10	21,0	(0,3)	19,0	21,9		
Punkt 3	10	22,7	(0,4)	19,7	23,9		
Alle Punkte	40	20,5	o	17,0	23,9	o	o
Mukusdicke nach Stimulation (µm)							
	N	Mittelwert (SE)		Min.	Max.	Koeffizient(SE)	
Punkt 0	61	17,8	(0,4)	14,1	28,2	1,7e-2	(2,2e-3)
Punkt 1	61	20,1	(1,0)	14,1	77,9		
Punkt 2	61	22,1	(0,5)	17,6	40,1		
Punkt 3	61	23,5	(0,7)	16,3	50,5		
Alle Punkte	244	20,9	o	14,1	77,9	o	o

A.3 Puplicationsliste

Paper

1. H. Schulz-Hildebrandt, M. Pieper, C. Stehmar, M. Ahrens, C. Idel, B. Wollenberg, P. König, and G. Hüttmann, "Novel endoscope with increased depth of field for imaging human nasal tissue by microscopic optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* 9(2), 636 (2018).
2. J. Horstmann*, H. Schulz-Hildebrandt*, F. Bock, S. Siebelmann, E. Lankenau, G. Hüttmann, P. Steven, and C. Cursiefen, "Label-Free In Vivo Imaging of Corneal Lymphatic Vessels Using Microscopic Optical Coherence Tomography," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58(13), 5880 (2017). *equally contributed
3. J. Horstmann, S. Siebelmann, H. Schulz-Hildebrandt, I. Glasunow, A. Schadschneider, and G. Hüttmann, "OCT verstehen - Teil 2: Praktische Aspekte und Anwendung," *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 234(2), 233–247 (2017).
4. J. Horstmann, S. Siebelmann, H. Schulz-Hildebrandt, I. Glasunow, A. Schadschneider, and G. Hüttmann, "OCT verstehen - Teil 1: Physikalische Grundlagen," *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 234(1), 131–143 (2017).
5. E. Guder, E. Lankenau, F. Fleischhauer, H. Schulz-Hildebrandt, G. Hüttmann, H. W. Pau, and T. Just, "Microanatomy of the tympanic membrane in chronic myringitis obtained with optical coherence tomography," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 272(11), (2015).

Proceedings

1. H. Schulz-Hildebrandt, M. Münter, M. Ahrens, H. Spahr, D. Hillmann, P. König, and G. Hüttmann, "Coherence and diffraction limited resolution in microscopic OCT by a unified approach for the correction of dispersion and aberrations," *Proc. SPIE*, 10591 Second Canterbury Work. Opt. Coherence Tomogr. Adapt. Opt. (March), (2018).
2. G. Borghesan, M. Ourak, E. Lankenau, G. Hüttmann, H. Schulz-Hildebrandt, K. Willekens, P. Stalmans, D. Reynaerts, and E. Vander Poorten, "Single Scan OCT-Based Retina Detection for Robot-Assisted Retinal Vein Cannulation," *J. Med. Robot. Res.* 0(0), 1840005 (2018).
3. S. Latus, C. Otte, M. Schlüter, J. Rehra, K. Bizon, H. Schulz-Hildebrandt, T. Saathoff, G. Hüttmann, and A. Schlaefer, "An Approach for Needle Based Optical Coherence Elastography Measurements (2017), 10434 LNCS.
4. G. Borghesan, M. Ourak, E. Lankenau, R. Neffin, P. Koch, H. Schulz-Hildebrandt, K. Willekens, P. Stalmans, D. Reynaerts, and E. Vander Poorten, "Probabilistic Principal Component Analysis and Particle Filtering for real-time retina detection from a single-fiber OCT," *CRAS2017* (September), (2017).

Vorträge

1. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Sabrina Lohmann, Tom Pfeiffer, Tim Eixmann, Martin Ahrens, Josua Rehra, Wolfgang Draxinger, Robert Huber, Gereon Hüttmann, „High-speed volumetric fiber scanning probe for optical coherence tomography“, *Spie Photonics West - Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXII*, 10483-27, (2018)

2. Naja Meyer-Schell, Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Michael Evers, Malte Casper, Gereon Hüttmann, Dieter Manstein, „Monitoring temperature induced phase changes in subcutaneous fatty tissue using a dynamic needle probe for optical coherence tomography“, Spie Photonics West - Endoscopic Microscopy XIII, 10470-20, (2018)
3. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Charlotte Sthemar, Martin Ahrens, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „Imaging of the upper airways in humans by endoscopic optical coherence tomography (eOCM)“, European Conferences on Biomedical Optics - EM4C • Endoscopic and Intra- operative Imaging II, EM4C.2, (2017)
4. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Benjamin Sauer, Fred Reinholz, Moritz Moltmann, Antje Klinger, Daniel Bremer, Hanna Zimmermann, Alexander Brandt, Raluca Niesner, Gereon Hüttmann, „Combined multiphoton microscopy and high resolution optical coherence tomography for intravital imaging“, Spie Photonics West - Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVII,10069-16, (2017)
5. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, „Endoscopic optical coherence microscopy“, The Cutaneous Biology Research Center at Massachusetts General Hospital/ Harvard Medical School (Dermatology), Boston, USA, (2016)
6. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „Endoscopic optical coherence microscopy for imaging the upper airways in humans“, Spie Photonics West - Optical Techniques in Pulmonary Medicine II, 9691-42, (2016)
7. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „High-speed imaging of in-vivo mice trachea with fourier domain optical coherence microscopy“, Spie Photonics West - Optical Techniques in Pulmonary Medicine II, 9304-115, (2015)
8. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Rehman Abdul, Christian Myrtus, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „Multiphoton tomography and optical coherence microscopy for imaging dynamic cellular process in the airways“, 11. Annual Retreat of the International Graduate Program “Molecular Biology and Medicine of the Lung” (MBML), Rauschholzhausen, Deutschland, (2013)

Posterpräsentationen

1. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Tom Pfeiffer, Tim Eixmann, Mario Pieper, Peter König, Robert Huber, Gereon Hüttmann, „Towards 3D in-vivo imaging of bronchial mucus transport by a novel all fiber based endoscope“, 7. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland, (2018)
2. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Adam M. Chaker, Carsten B. Schmidt-Weber, Peter König, Gereon Hüttmann, „A mobile device for clinical investigation of human nasal mucosa with endoscopic mOCT“, 7. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland, (2018)
3. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „A mobile device for clinical investigation of human nasal mucosa with endoscopic mOCT“, 7. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, München, Deutschland, (2017)
4. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Thomas Roeder, Peter König, Gereon Hüttmann, „Computational imaging for assessing airway remodeling in *Drosophila melanogaster*“, 6. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, München, Deutschland, (2017)

5. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Jaqueline Kasper, Nadine Traulsen, Peter König, Gereon Hüttmann, „Towards automated evaluation of mucus transport measured by microscopic OCT (mOCT) during hypertonic saline treatment of Cystic Fibrosis“, 5rd International DZL Symposium, Hamburg, Deutschland, (2016)
6. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „A compact endoscope for optical coherence microscopy (OCM) of the upper airways in humans“, 5. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Hannover, Deutschland, (2016)
7. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „Improved endoscopic optical coherence microscopy for imaging of humans airways in patients“, 4rd International DZL Symposium, Heidelberg, Deutschland, (2015)
8. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „Influence of aberrations on the image quality in optical coherence microscopy“, 4rd International DZL Symposium, Heidelberg, Deutschland, (2015)
9. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Peter König, Gereon Hüttmann, „Imaging ciliary motion by endoscopic optical coherence microscopy“, 3rd International DZL Symposium, Hannover, Deutschland, (2014)
10. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Mario Pieper, Christian Buj, Janine Markmann, Dirk Theisen-Kunde, Peter König, Gereon Hüttmann, „Towards endoscopic optical coherence microscopy (OCM) imaging of human airways“, 3. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Heidelberg, Deutschland, (2014)
11. Hinnerk Schulz-Hildebrandt, Daniel Kirsten, Gereon Hüttmann, „Forward scanning probe for 3D optical coherence tomography, “ Spie Photonics West - Endoscopic and Intravascular OCT - 8571-118, (2013)

Auszeichnungen

1. 1. Posterpreis beim 5. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung in Hannover in der Diseases Area Asthma; Hannover; 2016

A.4 Lebenslauf

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit und Durchführung meiner Forschung sowohl fachlich als auch persönlich unterstützt haben.

Ich möchte meinem Doktorvater Professor Dr. rer. nat. Gereon Hüttmann dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Forschungsinteressen in seinem Labor zu verfolgen. Sein enormes fachliches Wissen im Bereich der Naturwissenschaften, seinen Ideen und seine Unterstützung waren immer eine große Hilfe dabei. Des Weiteren gilt mein Dank Professor Dr. med. Peter König für viele Stunden der Diskussion über biologische Beobachtungen, seiner Unterstützung und Ermutigung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Zudem möchte ich auch Dr. rer. nat. Mario Pieper herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der biologischen Experimente und deren kritische Diskussion danken. Auch möchte ich den Kolleginnen und Kollegen am Institut für Biomedizinische Optik für ihre Hilfe bei vielen Kleinigkeiten danken. Danken möchte ich auch Reinhard Schulz von der wissenschaftlichen Werkstatt für die Anfertigung von feinmechanischen Bauteilen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Regina und Peter, möchte ich für ihre Liebe und Unterstützung während meines Studiums danken. Auch möchte ich meinem Sohn Johann Fedder danken, der durch seine Herzlichkeit mich jeden Morgen neu motiviert hat.

Abschließend möchte ich meiner Frau Bettina für ihre Liebe und Geduld, insbesondere während der Anfertigung dieser Arbeit, zutiefst danken.