



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

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

Dynamische mikroskopische Optische Kohärenztomografie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von

Michael Münter

aus Berlin

Berlin, 2024

1. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Gereon Hüttmann

2. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2024

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 7.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Kurzfassung	VII
1 Einleitung	1
2 Theorie	3
2.1 Biologisches Gewebe	3
2.1.1 Histologie	3
2.1.2 Zellen als Bausteine des Gewebes	4
2.2 Optik	8
2.2.1 Elektromagnetische Wellen	8
2.2.2 Kohärenz	10
2.2.3 Interferenz	12
2.2.4 Optische Abbildung	12
2.2.5 Superkontinuum-Lichtquellen	15
2.3 Optische Kohärenztomografie	15
2.3.1 Time-Domain OCT	16
2.3.2 Frequency-Domain OCT	17
2.3.3 Anwendungsfelder in der OCT	32
2.3.4 Hochauflösende OCT	33
2.3.5 Bewegung als Kontrast in der OCT	36
3 Material und Methoden	41
3.1 Mikroskopische OCT	41
3.1.1 Aufbau	41
3.1.2 Ansteuerung & Datenakquisition	44
3.1.3 Prozessierung der Rohdaten	45
3.1.4 Technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung	47
3.2 mOCT mit dynamischen OCT-Kontrast	49
3.2.1 Auswertung zur dmOCT	49
3.2.2 Charakterisierung der dynamischen mOCT	53

3.2.3	FF-TD-OCT	53
3.3	Biologische Proben	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Auswertung zur dmOCT	56
4.1.1	FF-TD-OCT / mOCT	58
4.1.2	dmOCT B-Scan	64
4.1.3	dmOCT Zeitserie	73
4.1.4	Zur Berechnung der Algorithmen zur dmOCT	77
4.2	Volumetrische mOCT mit 600 kHz A-Scan-Rate	81
4.2.1	Software zur Ansteuerung	81
4.2.2	Technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung	84
4.2.3	4D Darstellung dynamischer Transportvorgänge der Trachea	90
4.2.4	Volumetrische dmOCT	92
5	Diskussion	95
5.1	Dynamische OCT	95
5.1.1	FF-TD-OCT versus mOCT	95
5.1.2	mOCT mit dynamischen OCT-Kontrast	96
5.1.3	Vergleich der Spektrometer	101
5.1.4	mOCT und dmOCT mit 600 kHz A-Scan-Rate	103
5.2	OCT zur zellulären Bildgebung	104
6	Zusammenfassung	109
7	Ausblick	111
	Literaturverzeichnis	114
	Abbildungsverzeichnis	134
	Tabellenverzeichnis	136
	Anhang	137

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ATP	<i>Adenosinriphosphat</i>
CNR	<i>Kontrast-Rausch-Verhältnis</i>
dmOCT	<i>dynamische mOCT</i>
dOCT	<i>dynamische OCT</i>
FD-OCT	<i>Frequency-Domain OCT</i>
FF-OCT	<i>Full-Field OCT</i>
FOV	<i>Field of View</i>
FWC	<i>Sättigungskapazität</i>
FWHM	<i>Halbwertsbreite</i>
LF-OCT	<i>Line-Field OCT</i>
mOCT	<i>mikroskopische OCT</i>
NA	<i>Numerische Apertur</i>
OCT	<i>Optische Kohärenztomographie</i>
OCTA	<i>OCT-Angiografie</i>
PCA	<i>Hauptkomponentenanalyse</i>
PSF	<i>Punktspreizfunktion</i>
RIN	<i>Intensitätsrauschen</i>
SD-OCT	<i>Spectral-Domain OCT</i>
SNR	<i>Signal-Rausch-Verhältnis</i>
SS-OCT	<i>Swept-Source OCT</i>
STD	<i>Standardabweichung</i>
TD-OCT	<i>Time-Domain OCT</i>

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Verfahren zur kontrastreichen Bildgebung von zellulären- und subzellulären Strukturen mittels mikroskopischer Optischer Kohärenztomografie (OCT). Die auch als dynamischer OCT-Kontrast bezeichnete Methode basiert auf der Detektion von Bewegungen zellulärer- und subzellulärer Strukturen und einer anschließenden Auswertung. Im Theorieteil werden die biologischen und physikalischen Grundlagen als auch die OCT beschrieben. Die physikalischen und mathematischen Grundlagen der für den dynamischen OCT-Kontrast wichtigen Schritte werden in den darauffolgenden Kapitel genauer untersucht. Zuerst werden Ergebnisse mit einem mikroskopischen OCT-Aufbau bei einer A-Scan Rate von 248 kHz vorgestellt. Hierbei konnte anhand von Volumen- und B-Scan Aufnahmen von frischen *ex vivo* Gewebeproben eine Bildgebung mit dynamischen OCT-Kontrast mittels scannender Spectral-Domain OCT demonstriert werden. Zur Evaluation der Ergebnisse wurden diese mit einem Full-Field Time-Domain OCT-Aufbau verglichen. Die Abhängigkeit der axialen Auflösung durch Anpassung der Hann-Fensterung bei der Rekonstruktion auf den dynamischen OCT-Kontrast wurde untersucht. Zudem erfolgt eine Betrachtung des Kontrast-Rausch-Verhältnisses in Abhängigkeit zur Aufnahmezeit. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Aufnahmezeit von 100 ms ausreichend ist, um zelluläre- und subzelluläre Strukturen mittels dynamischen OCT-Kontrast zu visualisieren. In Zeitserien mit dynamischen OCT-Kontrast konnten Immunzellen in der Bewegung beobachtet werden, die mit herkömmlicher OCT-Bildgebung nicht hätten visualisiert werden können. Um die Bildgebungsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde eine Zeilenkamera mit einer Auslesegeschwindigkeit von 600 kHz für den mOCT-Aufbau eingesetzt. Hierfür wurde eine angepasste OCT-Software zur Online-Darstellung von B-Scans und eine Auswertungssoftware geschrieben. Anhand einer technischen Charakterisierung wurde die Zeilenkamera mit 248 kHz Ausleserate mit der 600 kHz Zeilenkamera verglichen. Die Vorteile einer schnelleren Bildgebung wurden durch die Darstellung dynamischer 4-dimensionaler Transportvorgänge in *ex vivo* Trachea gezeigt als auch an dynamischen OCT-Aufnahmen von unfixierten *ex vivo* Proben. Dynamische OCT erweitert die OCT durch die bisher nicht erreichte kontrastreiche Darstellung von Zellen und subzellulären Strukturen und stellt damit eine wichtige Applikation für hochauflösende OCT dar.

1 Einleitung

Optische Kohärenztomografie (engl. Optical Coherence Tomography, OCT) ist die Bezeichnung für ein bildgebendes Verfahren, welches 1991 von der Arbeitsgruppe um James G. Fujimoto veröffentlicht wurde [1] und hauptsächlich Anwendung in der Ophthalmologie findet. Sie beruht auf einem interferometrischen Messprinzip, verwendet keine ionisierende Strahlung und erreicht eine Auflösung im Mikrometerbereich bei einer Eindringtiefe von bis zu mehreren Millimetern in biologischen Gewebe, wobei typischerweise Tiefenschnittbilder innerhalb weniger Millisekunden aufgezeichnet werden.

Da in der OCT das nach Einstrahlung zurückreflektierte Licht gemessen wird, wird sie oft als optisches Äquivalent zur Sonografie bezeichnet. Aufgrund der Geschwindigkeit des Lichtes kann nicht die Zeit zwischen Einstrahlung und zurückgestreuten Licht wie in der Sonografie gemessen werden, sondern es wird eine indirekte Messung über die Interferenzeigenschaften des Lichts vorgenommen. In der OCT basiert der Kontrast auf zurückgestreuten Licht und daher auf streuenden Strukturen. Eine Besonderheit der OCT gegenüber anderen optischen Bildgebungsverfahren ist, dass die axiale Auflösung von der spektralen Bandbreite der verwendeten Lichtquelle und nicht von der numerischen Apertur (NA) des verwendeten Objektivs abhängig ist. Bei der OCT handelt es sich um kohärente Bildgebung. Diese ist geprägt von Speckle-Rauschen, welches als wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens gilt, da der Bildgebungscontrast reduziert wird [2-5].

Bereits 1993 wurden erste OCT-Aufnahmen von menschlicher Retina *in vivo* veröffentlicht [6, 7]. Dabei konnten verschiedene Strukturen wie beispielsweise Glaskörper, Retina, Nervenfaserschicht, Fovea und optischer Sehnerv identifiziert werden. Seitdem hat sie sich vor allem im Bereich der Ophthalmologie zum Goldstandard bei der Diagnostik der Retina entwickelt [8]. Darüber hinaus findet die OCT auch in anderen klinischen Bereichen wie beispielsweise Dermatologie, Kardiologie und Gastroenterologie Anwendung [9-12].

Eines der Ziele der OCT ist eine *in vivo* Histologie zu ermöglichen, sodass auf eine Biopsie und anschließende Fixierung und Einfärbung von Gewebeproben verzichtet werden kann [13-17]. Hierbei mindert das auftretende Speckle-Rauschen den Kontrast von zellulären und subzellulären Strukturen.

Die OCT unterliegt wie auch andere bildgebende Verfahren einer ständigen Weiterentwicklung hinsichtlich Auflösung, Kontrast und Messgeschwindigkeit [18]. Die mikroskopische OCT (mOCT) ist eine Variante der hochauflösenden OCT, die sich durch eine besonders hohe axiale als auch laterale Auflösung im Bereich von $1\ \mu\text{m}^3$ auszeichnet [19]. Häufiges Anwendungsgebiet hochauflösender OCT ist - wie auch in der konventionellen OCT - das Auge, aber auch andere Organe werden intensiv untersucht [20]. Durch die hohe Auflösung im Bereich von $1\ \mu\text{m}^3$ konnte in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden, dass die mOCT in der Lage ist, Zilien auf der Trachea *in vivo* aufzulösen, wodurch die Untersuchung verschiedener Ursachen von Erkrankungen ermöglicht wird [19, 21].

Die dynamische Optische Kohärenztomographie (engl. dynamic OCT, dOCT) ist eine neue Methode für hochauflösende OCT, die durch die Auswertung von Bewegungen von Zellen und subzellulären Strukturen im OCT-Bild von *in vivo* oder noch frischem *ex vivo* Gewebe einen neuen Kontrast erzeugt [22]. Diese in einer französischen Arbeitsgruppe um Claude Boccara entwickelte Technik hat das Potenzial, die bisherigen Anwendungsmöglichkeiten von hochauflösender OCT für verschiedenste Gebiete, wie Krebsforschung, Grundlagenforschung an Zellmodellen und auch für das Auge zu erweitern [23-25].

In dieser Arbeit wird die Implementierung der dOCT erstmals für scannende hochauflösende OCT beschrieben und evaluiert. Dafür werden zuerst theoretische Grundlagen zu Zellen und Gewebe sowie der Optik dargestellt. Anschließend werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Dabei wird auch eine in der OCT bisher nicht eingesetzte Zeilenkamera für die mOCT mit einer A-Scan-Rate von bis zu 600 kHz beschrieben.

Anhand von *ex vivo* Gewebeproben werden die Vor- und Nachteile von dOCT experimentell untersucht. Zur Auswertung der dOCT werden unterschiedliche Algorithmen evaluiert und diskutiert. Abschließend erfolgt eine Diskussion der Ergebnisse und eine Zusammenfassung sowie Ausblick für zukünftige Arbeitspakete und mögliche neue Anwendungsfelder im Bereich dOCT.

2 Theorie

2.1 Biologisches Gewebe

2.1.1 Histologie

Histologie ist die Wissenschaft von biologischem Gewebe, welches eine Ansammlung von Zellen darstellt, die auf kollektive Weise organisiert sind und somit eine gemeinsame Funktion erfüllen. Als Begründer der Histologie gilt Xavier Bichat, der die Organpathologie zur Gewebelehre weiterentwickelte und 21 Gewebearten als grundlegende Einheiten postulierte [26]. Heutzutage werden nur noch die vier Grundgewebearten Epithel-, Binde- (einschließlich Stütz-), Muskel- und Nervengewebe differenziert, wobei die Grenzen der Gewebearten in Organen teils fließend sind [27]. Epithelgewebe bedeckt Körperoberflächen, kleidet Körperhöhlen aus und bildet Drüsen. Muskelgewebe besteht aus kontraktile Zellen und ist verantwortlich für die Bewegung. Nervengewebe empfängt, überträgt und integriert Informationen von außen und innen. Bindegewebe unterlegt oder unterstützt die anderen drei Grundgewebe sowohl strukturell als auch funktionell.

Eine der heute noch wichtigsten Techniken der Histologie ist die Anfärbung und Untersuchung von Gewebeschnitten, um mittels Lichtmikroskop einzelne Zellen, bzw. Zellgewebe sichtbar zu machen. Die Präparation eines solchen Schnittes erfordert die Entnahme, Fixierung, Zuschnitt und die Anfärbung von Gewebe und ist damit relativ aufwendig. Mittels einer Biopsie wird Gewebe aus dem Körper entnommen und kann durch verschiedene Verfahren wie beispielsweise Kryofixierung, Formaldehyd oder Alkohol fixiert werden. Um Zellen oder subzelluläre Strukturen besser zu kontrastieren, werden die Proben in Mikrometer dünne Schnitte aufbereitet und anschließend eingefärbt. Darüber hinaus existieren auch moderne Schnellfärbeverfahren in Verbindung mit einer Kryofixierung, um den Zeitaufwand bis zur Untersuchung durch einen Pathologen auf wenige Minuten zu reduzieren. Dies ist besonders im klinischen Alltag wichtig, um Zeit- und Kostenaufwand während einer Operation, bei der eine schnelle pathologische Befundung notwendig ist, zu minimieren. Bei der Entnahme einer Gewebeprobe kann der Körper zusätzlich je nach Größe und Art der Biopsie geschädigt werden und es ist zudem nicht immer sichergestellt, ob das Gewebe an der richtigen Stelle

entnommen wurde. Bei der Aufbereitung der Probe können zusätzliche Schnittartefakte entstehen, die die nachfolgende Analyse erschwert. Auch die Einfärbung, um spezifische Merkmale innerhalb der Probe zu extrahieren, erfordert Erfahrung in der Anwendung und kann die Diagnose maßgeblich beeinflussen.

Der Bereich der Histopathologie beschäftigt sich mit krankhaften Veränderungen des Gewebes und ist damit ein wichtiger Bestandteil des klinischen Alltags. Feingewebliche Untersuchungen helfen dabei, Diagnosen von Tumorerkrankungen zu stellen und die Tumore zu klassifizieren. Ob es sich um benigne oder maligne Gewebeveränderungen handelt, bestimmt die Therapie und den Krankheitsverlauf. Form und Verteilung von Zellen, die das Gewebe bilden, sind damit ein wichtiger Indikator für mögliche krankhafte Veränderungen von Gewebe.

2.1.2 Zellen als Bausteine des Gewebes

Der Mensch besteht aus einer Gesamtmenge von bis zu 10^{13} Zellen, welche die Grundbausteine aller Gewebe und Organe sind [27]. Die Zelle (lat. cellula, kleine Kammer, Zelle) als kleinste lebende Einheit trägt alle Erbinformationen in sich und kann sich selbst kopieren. Zu den wichtigsten Vorgängen einer Zelle gehören die Mitose, Stoff- und Energiewechsel, Reaktion auf Reize, Bewegung, Wachstum sowie Entwicklung, Apoptose, als auch die Nekrose. Jede Zelle ist von einer semipermeablen Zellmembran umschlossen, welche aktiv oder durch Diffusionsprozesse den Stoffaustausch zur Umgebung ermöglicht. Zellen lassen sich in prokaryotische und eukaryotische Zellen differenzieren. Im Menschen vorkommende eukaryotische Zellen weisen im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen einen Zellkern mitsamt Kernhülle als auch Chromosomen mit darin enthaltender Erbsubstanz (DNA) auf, wie in Abbildung 1 (a) dargestellt [28]. Die Länge einer Zelle reicht von unter 10 Mikrometern (Blutzellen, Spermien) bis hin zu einem Meter (Neuron), schematisch dargestellt in Abbildung 1 (b). Als Organellen werden in ihrer Funktion zusammengehörige Teile einer Zelle bezeichnet [29]. Eukaryotische Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten enthalten einen oder mehrere Nuklei (Zellkerne). Ein Zellkern steuert den Zellstoffwechsel und wird durch die Kernhülle, bestehend aus zwei Membranen, vom Zytoplasma abgegrenzt. Die DNA, Karyolymphe als auch Nukleoli (Kernkörperchen) sind zur Bildung von RNA im Karyoplasma zuständig. Ribosomen sind Zellorganellen für die Proteinbiosynthese. Das raue (granuläres) und glatte (agranuläres)

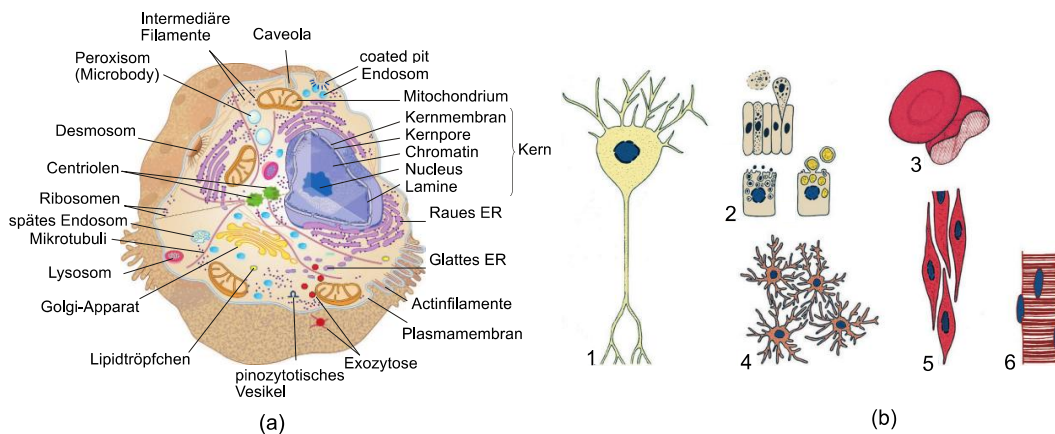


Abbildung 1: Eukaryotische Zellen (a) Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle mit Zellorganellen. ER = Endoplasmatisches Retikulum (b) Exemplarische Darstellung menschlicher Zellen: 1 - Nervenzelle; 2 - Verschiedene Drüsenzellen; 3 - Kernlose Erythrozyten; 4 - Knochenzellen; 5 - Glatte Muskelzellen; 6 - Quergestreifte Muskulatur mit mehreren Zellkernen. Nachgedruckt mit Genehmigung von [28] © Springer Nature

endoplasmatische Retikulum (Ergastoplasma) befindet sich in der Nähe des Kerns und bilden ein von Membranen umschlossenes Hohlraumsystem. Sie synthetisieren Lipide als auch Proteine und transportieren Stoffe und Flüssigkeiten zwischen Zellorganellen.

Als weiteres Zellorganell ist der Golgi-Apparat hauptsächlich für die Sekretion von auszuscheidenden Stoffen aus der Zelle zur Bildung von Lysosomen als auch zur Ausreifung von Kollagenfibrillen vorhanden. Lysosomen und Peroxisomen bauen beim Zellstoffwechsel entstandene Substanzen ab. Mitochondrien sind in fast allen Zellen vorhanden und verfügen über eine eigene mitochondriale DNA. Über die Atmungskette der Mitochondrien wird Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt.

Das Zytoskelett und Zentriolen bilden ein Zellorganell zur inneren, stabilisierenden Struktur. Das Zytoskelett erstreckt sich über die gesamte Zelle und ist mit der Zellmembran und den inneren Organellen verbunden, wodurch ein Rahmen für die zelluläre Organisation geschaffen wird. Dem Zytoskelett assoziiert sind die Motorproteine, wie beispielsweise Myosin, Kinesin und Dynein. Diese Moleküle bewegen spezifisches Material mittels ATP innerhalb der Zelle. Die Komponenten des Zytoskeletts können sich innerhalb weniger als einer Minute reorganisieren, oder über Stunden Stabilität gewährleisten. Es besteht aus den drei Hauptfadensystemen Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, schematisch dargestellt in Abbildung 2 nach [30]. Mikrofilamente sind Polymere des Proteins Aktin, die durch Aktin-bindende Proteine in funktionellen Bündeln und Netzwerken organisiert sind [30]. Mikrofilamente sind

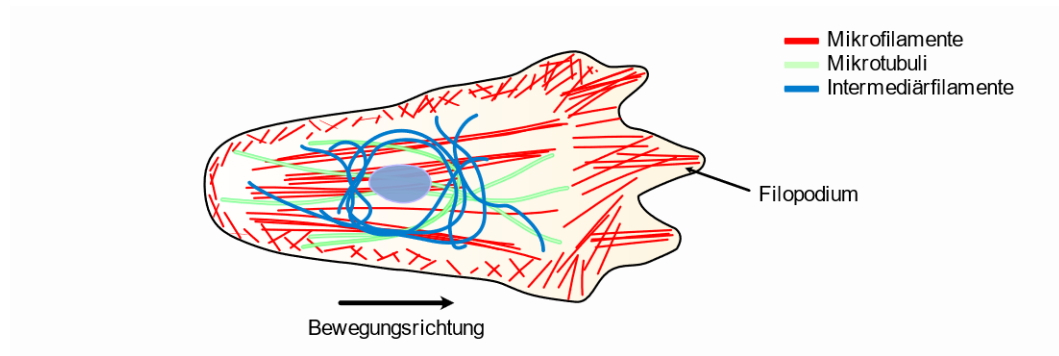


Abbildung 2: Zytoskelett einer wandernden Zelle, wie z.B. ein Fibroblast oder eine Makrophage. Mikrofilamente sind rot, Mikrotubuli grün und Intermediärfilamente dunkelblau dargestellt. Die Position des Zellkerns (hellblau) ist ebenfalls dargestellt.

besonders wichtig für die Organisation der Zellmembran und verleihen Oberflächenstrukturen wie Mikrovilli ihre Form. Sie funktionieren eigenständig oder dienen als Leiterbahnen für ATP-betriebene Myosin-Motorproteine, die eine kontraktile Funktion (wie im Muskel) ausüben oder Stoffe entlang der Mikrofilamente befördern. Mikrotubuli sind lange Röhren, die durch das Protein Tubulin gebildet und durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine organisiert werden [31]. Sie erstrecken sich oft über die gesamte Zelle und bieten ein organisatorisches Gerüst für assoziierte Organellen und eine strukturelle Unterstützung für Flimmerhärchen und Flagellen. Die Motorproteine Kinesin und Dynein transportieren Stoffe entlang der Mikrotubuli, welche wie Myosine durch ATP-Hydrolyse angetrieben sind. Intermediärfilamente sind gewebespezifische fadenförmige Strukturen, die eine Reihe verschiedener Funktionen erfüllen, darunter die strukturelle Unterstützung der Kernmembran als auch die Integrität von Zellen in Geweben gewährleisten. Im Gegensatz zu Mikrofilamenten und Mikrotubuli werden Intermediärfilamente von Motorproteinen nicht als Transportwege verwendet.

Zellorganisation und Bewegung

Aus der Dynamik der zellulären Aktivitäten und ihrer Veränderungen können Rückschlüsse auf die pathophysiologischen Zustände der Zellen geschlossen werden [32]. Ein wichtiger Indikator für metastasierende Krebszellen ist z. B. eine unregulierte Motilität der Zelle, die auf eine Fehlregulation des Zytoskeletts zurückzuführen ist. Die Tumorzellen lösen sich von ihrem Ursprungsgewebe und wandern an neue Orte, um Kolonien mit unkontrolliertem Wachstum zu bilden [30]. Das Zytoskelett, bestehend aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten sowie Zellorganellen

unterliegen bei malignen Zellen zudem einer hohen Dynamik durch ständige Neuorganisation. Die Zellmigration im Gewebe ist ein komplexer Vorgang, der vor allem durch den Zellkortex beeinflusst wird. Der Zellkortex ist die Zytoplasmaschicht, welche an der Innenseite der Zellmembran anliegt und eine hohe Dichte an Zytoskelettelementen aufweist. Aktinfilamente stoßen durch die Polymerisation von Aktin die bewegliche Plasmamembran in eine Richtung und bilden Filopodien und Lamellipodien, welche zur Lokomotion notwendig sind. Dieser zyklische Prozess zwischen Polymerisation und Depolymerisation des Aktin in Zusammenspiel mit Motorproteinen bei ATP-Verbrauch führt zu einer gerichteten Bewegung. Auf zellulärer bzw. molekularer Ebene lassen sich dabei vier wesentliche Prozesse abgrenzen. Transienter lokaler Einstrom von Ca^{2+} , Wasser und anderen Ionen verflüssigt Aktin, wodurch die Lamellipodien beweglich werden. Nach Ca^{2+} Abfall und Wasserabstrom polymerisiert das Aktin wieder und stößt das Lamellipodium in Bewegungsrichtung. Dazu wird am anderen Ende der Zelle die Plasmamembran endozytiert und die intrazellulär entstandenen Vesikel werden entlang der Mikrotubuli in den vorderen Abschnitt der Zelle transportiert. In dem in der Bewegung befindlichen vorderen Teil der Zelle wird NaCl und Wasser aufgenommen, wodurch sich dieser Bereich vergrößert und nach vorne verschiebt. Dazu entsprechend werden Ionen am anderen Ende über Kanäle zusammen mit Wasser aus der Zelle gelassen, was zu einer Schrumpfung führt [33]. Die Geschwindigkeit der Bewegung einer Zelle kann abhängig vom Zelltyp zwischen 0.1 - 0.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Epithelzellen) bis hin zu 5 - 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ (weiße Blutkörperchen) betragen [33]. Beispiele für Zellbewegungen sind beispielsweise Leukozyten bei der Immunabwehr pathogener Erreger und Fibroblasten (Bindegewebszellen), welche sich in Wunden zur Erneuerung der extrazellulären Matrix bewegen. Auch Epithelzellen bewegen sich, um die durch abgestorbene Zellen auftretenden Epithellöcher zu füllen. Als einer der wichtigsten Energieträger der Zelle wird ATP hauptsächlich für den aktiven Transport von Ionen durch die Zellmembran verbraucht. Unter anderem ist ATP auch für den Transport von Teilchen innerhalb einer Zelle und für die Bewegung von zellulären Bestandteilen oder Muskeln notwendig. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ohne ATP-Verbrauch keine aktive Bewegung möglich ist [34].

2.2 Optik

Unter dem Begriff Licht wird im Allgemeinen der für das menschliche Auge sichtbare Anteil des elektromagnetischen Spektrums von 380 nm bis 780 nm bezeichnet. Der bei kürzeren Wellenlängen angrenzende Bereich unter 380 nm wird als Ultraviolettstrahlung und der über 780 nm hinausgehende Wellenlängenbereich bis 1 mm als Infrarotstrahlung bezeichnet.

Die simpelste Theorie zur Beschreibung der Ausbreitung von Licht ist die geometrische Optik. Darüber hinaus existieren weitere Modelle, wie Wellenoptik, Quantenoptik und statistische Optik, die der Beschreibung weiterer Eigenschaften von Licht dienen. Phänomene wie Beugung und Brechung werden durch die Wellenoptik beschrieben. Die Quantenphysik erlaubt eine umfassende Beschreibung von Licht als Quantenobjekte (Photonen). In dieser Arbeit genügt zur analytischen Beschreibung von Licht die Beschreibung als elektromagnetischen Wellen, die im Folgendem näher erläutert wird.

2.2.1 Elektromagnetische Wellen

Abgeleitet aus der maxwellschen Theorie beschreibt die raum- und zeitabhängige Wellengleichung im ladungs- und stromfreien Vakuum

$$\nabla^2 U(z, t) = \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} U(z, t) \quad 2.1$$

die Ausbreitung eines mit der Zeit t veränderlichen elektrischen Feldes U mit der Lichtgeschwindigkeit c_0 [35]. Diese Ausbreitungsgeschwindigkeit ergibt sich aus der elektrischen Feldkonstante ϵ_0 und der magnetischen Feldkonstante μ_0

$$c_0 = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} \quad 2.2$$

Die Vakuumlichtgeschwindigkeit c_0 ist eine fundamentale Naturkonstante und wurde auf 299.792.458 m/s festgelegt. Für eine detaillierte Beschreibung zur Herleitung der Wellengleichung aus den maxwellschen Gleichungen sei auf die Literatur [36] verwiesen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer elektromagnetischen Welle c in einem Medium ergibt sich aus dem Verhältnis von Lichtgeschwindigkeit im Vakuum c_0 zur Wurzel von relativer Permittivität ϵ_r und relativer Permeabilität μ_r des Mediums

$$c = \frac{c_0}{\sqrt{\epsilon_r \mu_r}} \quad 2.3$$

und ist damit im Medium in der Regel geringer als im Vakuum. Eine daraus abgeleitete Konstante ist der Brechungsindex n . Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis von Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und Ausbreitungsgeschwindigkeit der elektromagnetischen Welle im betrachteten Medium:

$$n = \sqrt{\epsilon_r \mu_r} = \frac{c_0}{c} \quad 2.4$$

Das elektrische Feld $U(z, t)$ des Lichtes kann aufgrund der hohen Oszillationsfrequenz nicht direkt gemessen werden. Messbar ist nur die Intensität I , wobei gilt:

$$I(z) \sim \langle (U^*(z, t)U(z, t)) \rangle. \quad 2.5$$

$\langle \rangle$ beschreibt die zeitliche Mittelung des elektrischen Feldes.

Periodische Wellen

Ein Spezialfall elektromagnetischer Wellen sind harmonische Wellen [37]. Unter der Annahme einer zeitlich periodischen Abhängigkeit mit einer festen Kreisfrequenz ω , kann das Feld auch durch die komplexe harmonische Funktion

$$U(z, t) = U(z)e^{-i\omega t} \quad 2.6$$

beschrieben werden. Hierbei gilt, dass die Kreisfrequenz ω mit der Kreiswellenzahl k über $k = \frac{\omega}{c}$ zusammenhängt. $U(z)$ muss dann die Helmholtz-Gleichung

$$0 = \nabla^2 U(z) + k^2 U(z) \quad 2.7$$

erfüllen. Die Kreiswellenzahl ist reziprok proportional zur Wellenlänge λ mit $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ und die Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$ proportional zur Frequenz f . Die Frequenz bestimmt die Farbe des Lichtes, sodass im Fall von harmonischen Wellen auch von monochromatischem Licht gesprochen wird. Im Bereich des sichtbaren bis zum nahinfraroten Licht liegen die Frequenzen in einem Bereich von 10^{14} - 10^{16} Hz.

Dispersion, Phasen- und Gruppengeschwindigkeit

Aus Gleichung 2.4 folgt, dass die Kreiswellenzahl k über den Brechungsindex n mit der Kreisfrequenz ω der elektromagnetischen Strahlung gekoppelt ist:

$$k(\omega) = \frac{n(\omega)}{c_0} \cdot \omega \quad 2.8$$

Im Vakuum ist der Brechungsindex für alle Wellenlängen konstant gleich eins und die Kreiswellenzahl streng proportional zur Kreisfrequenz, was im Fall der Ausbreitung von Licht in Materie nicht mehr zutrifft. Die Abhängigkeit von Ausbreitungsgeschwindigkeit beziehungsweise Brechungsindex von der Frequenz der Strahlung wird als Dispersion bezeichnet. Die in Gleichung 2.4 definierte Ausbreitungsgeschwindigkeit einer monochromatischen Welle wird als Phasengeschwindigkeit v_p bezeichnet:

$$v_p = \frac{\omega}{k(\omega)} = \frac{c}{n(\omega)}, \quad 2.9$$

da sie die Geschwindigkeit angibt, mit der sich die Phase einer Lichtwelle im Raum ausbreitet. Im Fall von breitbandigem Licht und Dispersion beschreibt eine weitere Größe, die Gruppengeschwindigkeit v_g , die Geschwindigkeit, mit der sich die Einhüllende eines Wellenpakets ausbreitet:

$$v_g = \frac{\partial \omega}{\partial k} \quad 2.10$$

Ist die Gruppengeschwindigkeit nicht konstant, läuft das Wellenpaket auseinander, da sich unterschiedliche spektrale Anteile des Wellenpakets mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ausbreiten.

2.2.2 Kohärenz

Zwei Wellen werden als kohärent zueinander bezeichnet, wenn sie über Zeit und Raum eine konstante Phasenbeziehung haben und dadurch interferenzfähig sind. Allgemeiner wird die Korrelation des elektromagnetischen Wellenfeldes als Kohärenz bezeichnet [38]. Die Kohärenzfunktion $\Gamma(z_1, t_1, z_2, t_2)$ beschreibt die Korrelation des Feldes an den Orten z_1 und z_2 und den Zeiten t_1 und t_2

$$\Gamma(z_1, t_1, z_2, t_2) = \langle U(z_1, t_1), U^*(z_2, t_2) \rangle_t \quad 2.11$$

Als Kohärenzgrad wird die normierte Kohärenzfunktion γ eingeführt:

$$\gamma(z_1, t_1, z_2, t_2) = \frac{\Gamma(z_1, t_1, z_2, t_2)}{\sqrt{\Gamma(z_1, t_1, z_1, t_1) \cdot \Gamma(z_2, t_2, z_2, t_2)}} \quad 2.12$$

Der Grad der Kohärenz an zwei räumlich unterschiedlichen Punkten zur gleichen Zeit wird als räumliche Kohärenz bezeichnet, wohingegen die Kohärenz an einem Punkt zu verschiedenen Zeiten als zeitliche Kohärenz bezeichnet wird. Für diese Arbeit ist weiter nur die zeitliche Kohärenz

$$\Gamma_t(\Delta t) = \langle U(t), U^*(t + \Delta t) \rangle \quad 2.13$$

und der zeitliche Kohärenzgrad

$$\gamma(\Delta t) = \frac{\Gamma(\Delta t)}{\Gamma(0)} \quad 2.14$$

bedeutend. $\Gamma_t(0)$ entspricht der Intensität I an dem betrachteten Punkt und ist der betragsmäßig größte Wert der Autokorrelation, womit $|\gamma(\Delta t)| \leq 1$ gilt. In einem Interferenzexperiment mit gleicher Intensität der Teilstrahlen entspricht der Betrag des komplexen Selbstkohärenzgrad $|\gamma(\Delta t)|$ der bereits von Michelson eingeführten Kontrastfunktion K :

$$K = \frac{(I_{max} - I_{min})}{(I_{max} + I_{min})} = |\gamma(\Delta t)| \quad 2.15$$

Für eine ideale periodische Welle $U(t) = U(t)e^{-i\omega t}$ nimmt der Betrag des zeitlichen Kohärenzgrads immer den Wert 1 an. Es wird zwischen vollkommen kohärent ($|\gamma(\Delta t)| = 1$), partiell kohärent ($0 < |\gamma(\Delta t)| < 1$) und vollkommen inkohärent ($|\gamma(\Delta t)| = 0$) unterschieden. In der Praxis nimmt die messbare Kontrastfunktion für natürliche und künstliche Lichtquellen mit zunehmendem Δt ab. Eine wichtige Charakterisierungsgröße ist die Kohärenzzeit τ_c , bei der der Betrag des Kohärenzgrades auf $\frac{1}{e}$ abgefallen ist. Die Kohärenzlänge $l_c = \frac{c}{\tau_c}$ entspricht der Strecke, die das Licht in der Zeit τ_c zurücklegt. Nach dem Wiener-Chintschin-Theorem ist die zeitliche Kohärenzfunktion $\Gamma(\Delta t)$ die Fouriertransformierte des Leistungsspektrums $|\tilde{U}(\omega)|^2$.

$$\Gamma(\Delta t) = \int |\tilde{U}(\omega)|^2 e^{-i2\pi\omega t} d\omega \quad 2.16$$

mit

$$U(t) = \int \tilde{U}(\omega) e^{-i2\pi\omega t} d\omega \quad 2.17$$

2.2.3 Interferenz

Interferenz beschreibt bei der Superposition von zwei kohärenten elektromagnetischen Wellen

$$U(\omega) = U_1(\omega) + U_2(\omega) \quad 2.18$$

das Phänomen der Abhängigkeit der Intensität von der Phasendifferenz [36]. Für die von einem Detektor gemessene Intensität I bei Überlagerung $U(\omega)$ zweier periodischer Wellen ($U_1(\omega), U_2(\omega)$) mit einem Phasenversatz ϕ , gilt

$$U_1(\omega) = U_1(\omega) e^{-i k \omega} \quad 2.19$$

$$U_2(\omega) = U_2(\omega) e^{-i k \omega + \phi}$$

$$\begin{aligned} I &\sim \langle |U(\omega)|^2 \rangle \\ &= \langle |U_1(\omega) + U_2(\omega)|^2 \rangle \\ &= \langle |U_1(\omega)|^2 + |U_2(\omega)|^2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\Delta\phi) \rangle \end{aligned}$$

Die gemessene Intensität ist die Summe der Einzelintensitäten und des Terms $2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\Delta\phi)$, welcher von der Phasendifferenz $\Delta\phi$ zwischen den beiden Wellen abhängt und das vom Detektor gemessene Interferenzmuster bestimmt.

2.2.4 Optische Abbildung

Als Abbildung wird in der Optik die Erzeugung eines Bildes von einem Gegenstand durch Licht mithilfe eines optischen Systems bezeichnet. Dieses besteht typischerweise aus einer Linse oder einem System von Linsen. Die Auflösung eines bildgebenden Systems, welche angibt inwieweit kleine Strukturen abgebildet werden können, wird durch Beugung des Lichts begrenzt. Ein optisches System, dessen Auflösungsvermögen an der theoretischen Grenze des Instruments liegt, da es keine Aberrationen aufweist, gilt als beugungsbegrenzt. Die Fourier-Optik beschreibt die Ausbreitung des Lichtes unter Berücksichtigung der Wellennatur mithilfe der Fourier-Analyse. Die Polarisation wird dabei vernachlässigt. Nach der Fourier-Analyse muss im Frequenzraum genügend Bandbreite vorhanden sein, um feine Details in einem Bild abbilden zu können. Feine

Details entsprechen in einem Bild hohen Frequenzen im Fourier-Raum. Bei einer Abbildung entsprechen Linsen optischen Tiefpassfiltern, da nur ein Teil des Lichts von einem Punkt durch die Apertur der Linse durchtreten kann. Die Wirkung einer Linse auf die Abbildung wird durch die Pupillenfunktion $P(x,y)$ beschrieben. Diese ist für eine aberrationsfreie Linse:

$$P(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{innerhalb der Linsenapertur} \\ 0 & \text{außerhalb} \end{cases} \quad 2.20$$

Ein Punktssignal, welches nach der Fourier-Analyse einem konstanten Spektrum entspricht, kann von einem abbildenden System nur bis zu einer bestimmten Grenzfrequenz übertragen werden. Dabei besteht ein wesentlicher Unterschied in der Bildgebung mit kohärenter und inkohärenter Beleuchtung, welcher auch mit der Theorie der Fourier-Optik beschrieben werden kann [39].

Bei kohärenter Beleuchtung ist die Bildgebung linear in der komplexen Amplitude. Die Amplitudenspreizfunktion eines Objektivs ist definiert als die räumliche Verteilung der Amplitude des Bildes auf dem Detektor, wenn das Objektiv von einer perfekten Punktquelle beleuchtet wird. Das komplexe Wellenfeld in der Bildebene U_{Bild} entspricht der Faltung der Objektwelle U_{Obj} mit der Amplitudenspreizfunktion (auch kohärenten Punktspreizfunktion) P_{ASF} :

$$U_{Bild} = P_{ASF} * U_{Obj} \quad 2.21$$

Entsprechend dem Faltungstheorem ist die Fouriertransformierte der Bildebene $\mathcal{F}(U_{Bild}) = u_{Bild}$ die Multiplikation aus komplexer Amplitudentransferfunktion p_A und der Fouriertransformierten der Objektwelle u_{Obj} :

$$u_{Bild} = p_A \cdot u_{Obj} \quad 2.22$$

Die Amplitudenspreizfunktion kann auch als Fouriertransformierte der Pupillenfunktion beschrieben werden. Sie stellt eine wichtige Vergleichsgröße dar, um das Auflösungsvermögen eines optischen Systems zu beschreiben. Die maximale Grenzfrequenz der kohärenten Transferfunktion eines beugungsbegrenzten Systems kann durch

$$v_{\max \& \text{ kohärent}} = \frac{D}{2\lambda f} \quad 2.23$$

beschrieben werden, wobei f die Brennweite der Linse ist [40].

Im Fall von inkohärenter Bildgebung, bei der keine feste Phasenbeziehung zwischen Strahlen, die aus unterschiedlichen Teilen des zu untersuchenden Objektes stammen, vorhanden ist, addieren sich die Intensitäten linear [41] und die Bildentstehung kann über eine Faltung der Intensität des Objektes I_{Obj} mit der Punktspreizfunktion P_{PSF} und dem Bild I_{Bild} ausgedrückt werden:

$$I_{Bild} = P_{PSF} * I_{Obj} \quad 2.24$$

Die Punktspreizfunktion P_{PSF} entspricht dem Betragsquadrat der Amplitudenspreizfunktion $P_{PSF} = |P_{ASF}|^2$. Nach Fourier-Transformation kann die inkohärente Bildentstehung auch durch

$$i_{Bild} = p_{OTF} \cdot i_{Obj} \quad 2.25$$

ausgedrückt werden, wobei i_{Bild} die Fouriertransformierte der Bildintensität und i_{Obj} die Fouriertransformierte der Objektintensität ist. Die Fouriertransformierte der Punktspreizfunktion ist die optische Transferfunktion p_{OTF} . Die optische Transferfunktion (OTF) entspricht der Autokorrelierten der Amplitudentransferfunktion. Der Betrag der OTF wird als Modulationstransferfunktion (MTF) und die Phase als Phasentransferfunktion (PTF) bezeichnet. Die MTF beschreibt das Kontrastverhältnis zwischen Bild und Objekt. Die inkohärente Transferfunktion eines beugungsbegrenzten Systems reicht bis zu einer Frequenz, die das Doppelte der Grenzfrequenz der kohärenten Übertragungsfunktion beträgt und ist durch

$$v_{\max \& \text{ inkohärent}} = \frac{D}{\lambda f} \quad 2.26$$

gegeben [40]. Die inkohärente Grenzfrequenz bestimmt die maximal übertragbare Frequenz der Bildintensität, während sich die kohärente Grenzfrequenz auf Frequenzkomponenten der Bildamplitude bezieht.

2.2.5 Superkontinuum-Lichtquellen

Als Superkontinuum bezeichnet man ein Kontinuum optischer Frequenzen oder Licht, welches mit nichtlinearen Prozessen erzeugt wird. Superkontinuum-Laser emittieren breitbandiges Licht im sichtbaren (VIS) und infraroten (IR) Spektralbereich [42]. Das Phänomen des Superkontinuums, bei dem durch Frequenzverbreitung „weißes“ Licht erzeugt wird, wurde erstmals 1970 beschrieben [43]. In den letzten Jahren wurde die Erzeugung des Superkontinuums in verschiedenen nicht-linearen Materialien studiert. Insbesondere mit ultrakurz gepulsten Lasersystemen, wie beispielsweise Titan:Saphir-Laser konnten Spektren von UV bis IR mit hoher räumlicher Kohärenz erzeugt werden. Durch diese einmaligen Eigenschaften einer hohen räumlichen Kohärenz mit einer sehr geringen zeitlichen Kohärenz fanden Superkontinuum-Lichtquellen weite Verbreitung in verschiedensten Anwendungsfeldern wie beispielsweise in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und in der optischen Kohärenztomografie [44, 45]. Heute werden zur Erzeugung räumlich kohärenter Strahlung photonische-Kristallfasern (engl. Photon Crystal Faser, PCF), in welche ultrakurze Laserpulse fokussiert werden, eingesetzt. Dabei werden Pikosekunden- bis Nanosekundenpulse mit Wiederholraten von MHz bis GHz mit einer Bandbreite von typischerweise 400 - 2500 nm erzeugt [42]. Zum weiteren Verständnis der grundlegenden Mechanismen zur Erzeugung des Superkontinuums wird an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen [45-47].

2.3 Optische Kohärenztomografie

Optische Kohärenztomografie (engl. Optical Coherence Tomography, OCT) ist die Bezeichnung für ein optisches Bildgebungsverfahren, welches sich insbesondere zur hochaufgelösten Abbildung von Strukturen in streuenden Proben eignet [48-51]. OCT ähnelt in ihrem Ansatz - Einstrahlung einer Welle in ein Objekt und Messung der Laufzeit der Rückstreuung - der Sonografie. Da in der OCT elektromagnetische Wellen zur Bildgebung genutzt werden, basiert die Bildgebung auf der Rückstreuung von Licht an Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechungsindex in der zu untersuchenden Probe. OCT bietet eine Auflösung in Mikrometerbereich bei einer Eindringtiefe von bis zu mehreren Millimetern und schließt damit eine Lücke zwischen Ultraschall-Bildgebung und Konfokalmikroskopie (KM) [52]. Auflösungsvermögen und Eindringtiefe der OCT sind im Vergleich zu anderen prominenten Bildgebungsmethoden in Abbildung 3 dargestellt. Von

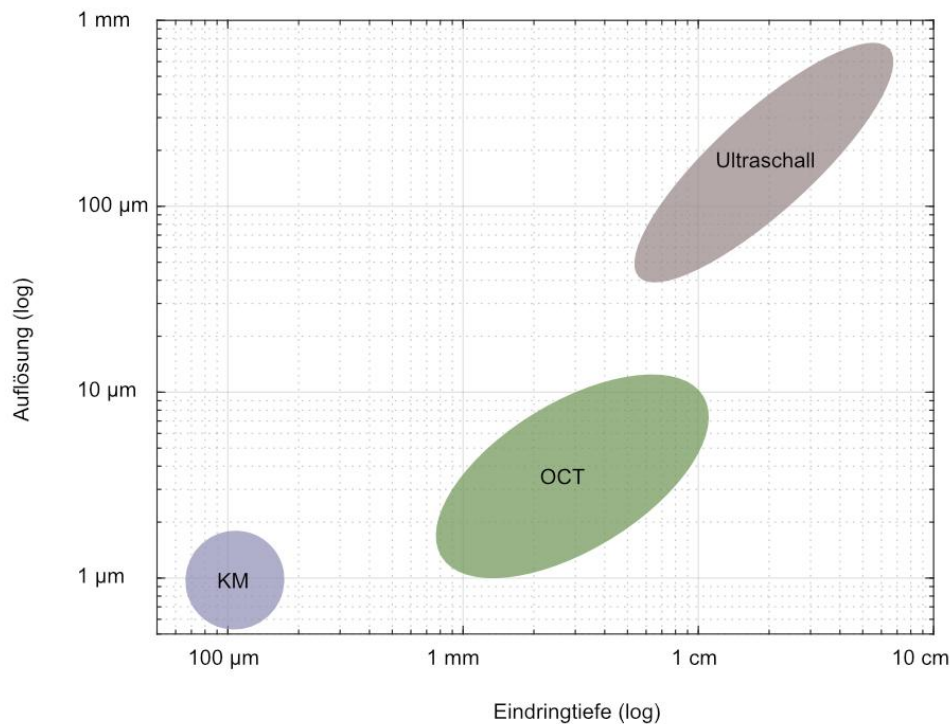


Abbildung 3: Auflösungsvermögen und Eindringtiefe von OCT im Vergleich zu Konfokalmikroskopie (KM) und Ultraschall-Bildgebung (Ultraschall). OCT erreicht typischerweise eine Auflösung im Bereich von 5 - 10 μm bei einer Eindringtiefe bis zu mehreren Millimetern. In der Forschung eingesetzte hochauflösende OCT Systeme erreichen eine Auflösung von bis zu 1 μm . Damit reiht sich die OCT als bildgebendes System zwischen Ultraschall-Bildgebung und Konfokalmikroskopie (KM) ein.

anderen optischen Bildgebungsverfahren, wie Multiphotonenmikroskopie, Lichtmikroskopie oder Konfokalmikroskopie grenzt sich die OCT durch eine von der lateralen unabhängigen axialen Auflösung ab. In der OCT ist die axiale Auflösung vom Spektrum der Lichtquelle abhängig. Die laterale Auflösung ergibt sich aus der verwendeten NA des Objektivs. Typische axiale und laterale Auflösungen von OCT-Systemen liegen im Bereich von 5 - 10 μm bzw. 10 - 20 μm . Analog zur Sonografie wird in der OCT ein an einer Stelle gemessenes Tiefenprofil als A-Scan bezeichnet. Durch Abrasterung der Probe entlang einer Achse bzw. zweier Achsen wird ein Tiefenschnittbild (B-Scan) bzw. Volumen erzeugt.

2.3.1 Time-Domain OCT

OCT wurde erstmalig 1991 als Time-Domain OCT (TD-OCT) Verfahren beschrieben [1]. TD-OCT basiert auf der Verwendung einer breitbandigen Lichtquelle zusammen mit einem im Referenzarm verfahrbaren Spiegel. Ein schematischer TD-OCT Aufbau ist in Abbildung 4 dargestellt. Das Licht wird in einem Strahlteiler in einen Referenz- und Objektarm

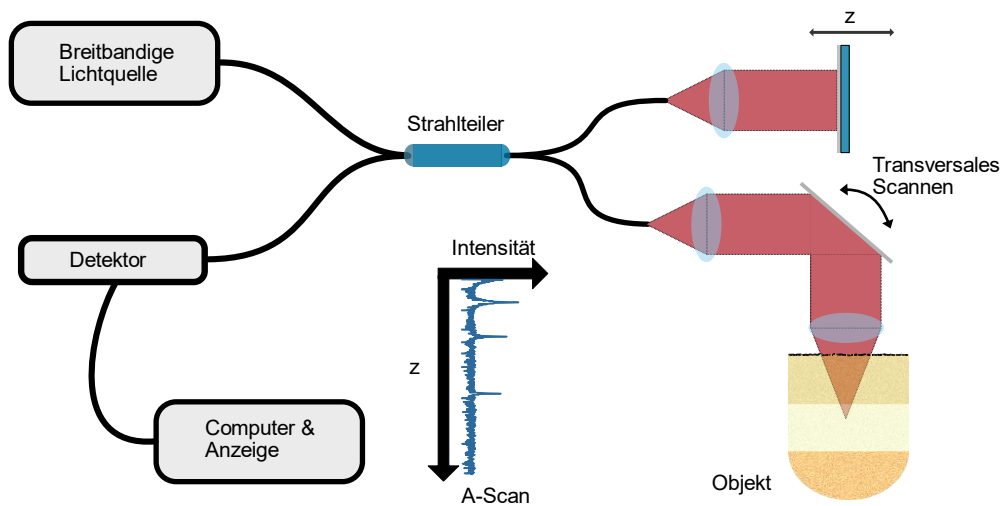


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines TD-OCT Aufbaus - Eine Lichtquelle emittiert breitbandiges Licht, welches über einen Strahlteiler in einen Referenz- und Objektarm aufgeteilt wird. Ein Teil des aus beiden Armen zurückreflektierten Lichts interferiert auf dem Detektor, wenn der Weglängenunterschied in den beiden Armen gleich ist. Durch Änderung des Weglängenunterschieds Δz wird ein A-Scan des Objektes aufgenommen.

aufgespalten. Das vom Referenzarm und vom Objekt zurückgestreute Licht wird am Detektor aufgezeichnet. Interferenz entsteht nur, wenn die Laufzeitunterschiede von Proben- und Referenzlicht innerhalb der Kohärenzlänge liegen. Durch Veränderung der Referenzstrecke z und transversales Scannen in xy kann die Probe sequenziell tiefenaufgelöst abgetastet werden.

2.3.2 Frequency-Domain OCT

Bereits 1995 veröffentlichte Fercher et al. [53] einen neuen Ansatz zur Detektion eines A-Scans, der seither als Frequency-Domain OCT (FD-OCT, teils auch als Fourier-Domain OCT) bezeichnet wird. Im Gegensatz zur TD-OCT bleibt der Referenzspiegel starr und ein komplettes Tiefenprofil wird aus der spektralen Abhängigkeit der Interferenz berechnet. Nach Umrechnung von Wellenlänge auf die Kreiswellenzahl und Fourier-Transformation kann der A-Scan rekonstruiert werden. Nach Einführung der FD-OCT konnte experimentell schnell bestätigt werden, dass im Vergleich zur TD-OCT bei gleicher oder besserer Bildqualität eine höhere Messgeschwindigkeit erreicht werden kann [54]. Durch die parallele Detektion der Tiefeninformationen in der FD-OCT können gegenüber der sequenziellen Detektion eines A-Scans in der TD-OCT bei gleicher Aufnahmezeit und Bestrahlungsstärke mehr Photonen detektiert werden. Der durch die parallelisierte

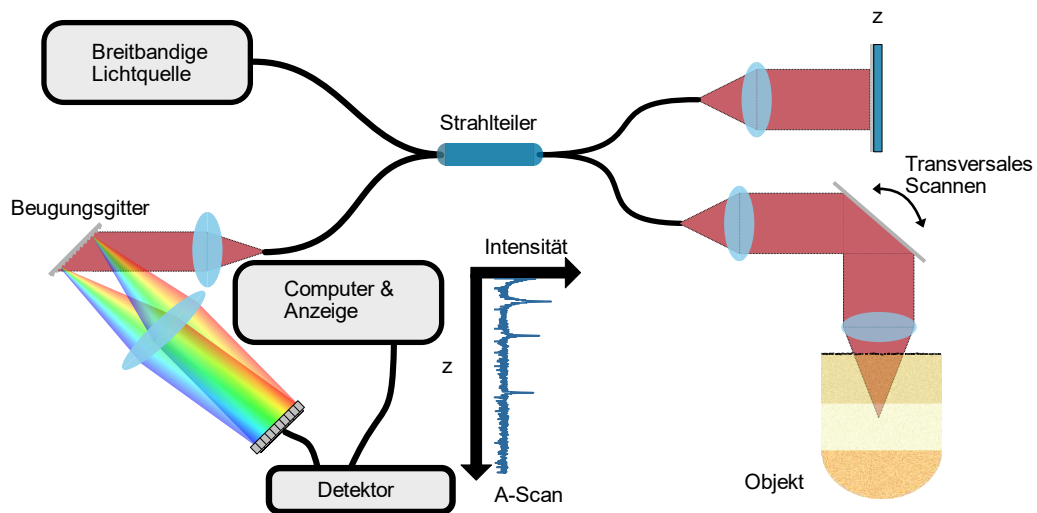


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines SD-OCT Aufbaus - Der Aufbau ist ähnlich zu TD-OCT. Der Referenzspiegel ist fixiert und die einzelnen Spektralanteile des breitbandigen Lichts werden nach Aufspaltung an einem Gitter typischerweise an einem Zeilendetektor detektiert. Alternativ dazu arbeitet SS-OCT mit durchstimmbaren Lichtquellen, bei denen die einzelnen Spektralanteile an einer Photodiode gemessen werden.

Detektion mögliche Sensitivitätsvorteil konnte in drei voneinander unabhängig erschienenen Veröffentlichungen theoretisch beschrieben werden [55-57]. Systeme, die sich diesem Ansatz zur Parallelisierung zunutze machen, können weiterhin nach Art der spektral separierten Detektion in zwei Klassen unterteilt werden [58]. Spektrometer basierte FD-OCT Systeme nutzen Gitter, um das breitbandige Licht vor der Detektion spektral aufzuspalten (engl. Spectral-Domain OCT, SD-OCT, auch Fourier-Domain OCT), schematisch dargestellt in Abbildung 5. Die wellenlängenabhängige Interferenzintensität wird dann in der Regel mit einem Zeilendetektor gemessen [59]. Als Alternative dazu arbeiten Swept-Source basierte OCT-Systeme (SS-OCT, auch Optical Frequency Domain Imaging) mit durchstimmbaren Lichtquellen, welche einzelne Wellenlängen sequenziell erzeugen, sodass die wellenlängenabhängige Interferenzintensität als Zeitverlauf mit Photodioden detektiert werden kann.

Signalerzeugung in der FD-OCT

OCT misst in einem streuenden Medium die Abhängigkeit des Streuvermögens von der Tiefe durch indirekte Messung der Laufzeit der Strahlung. Da aufgrund der hohen Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts die Laufzeit zwischen Einstrahlung und Detektion nicht direkt erfasst werden kann, wird ein interferometrischer Ansatz genutzt. Als Lichtquellen werden häufig Superlumineszenzdiode (SLD) eingesetzt, welche

kurzkohärentes Licht im nah-infraroten Wellenlängenbereich emittieren [48]. Die elektromagnetische Welle der Lichtquelle wird in einem Interferometer in eine Referenz- $R(k)$ und Objektwelle zur Bestrahlung der zu untersuchenden Probe aufgeteilt. Die Referenzwelle wird in einen Referenzstrahlengang ausgekoppelt und zusammen mit der Überlagerung der aus unterschiedlichen Tiefen der Probe zurückgestreuten Anteile der Probenbeleuchtung $O(k)$ auf dem Detektor zur Interferenz gebracht. Im Folgenden wird die Theorie zur Signalentstehung für FD-OCT wiedergegeben. Diese folgt der Beschreibung nach H. Spahr und J. Fujimoto [48, 60]. Nachdem das vom Objekt zurückreflektierte elektrische Feld den Strahlteiler passiert, kann es durch

$$R(k) = A_R A_C(k) e^{ikz_0} \quad 2.27$$

$$O(k) = A_O A_C(k) \int \eta(z') e^{ik(z_0+2z')} dz' \quad 2.28$$

beschrieben werden. A_R ist hierbei ein Faktor, der die Amplitudentransmission des Referenzarms und die Reflektivität des Referenzspiegels beschreibt. $A_C(k)$ beschreibt die spektrale Form der Lichtquelle. A_O stellt äquivalent zur A_R die Transmission des Objektarms dar. z' beschreibt die Weglängendifferenz relativ zu z_0 . $\eta(z)$ ist der tiefenabhängige Amplitudenstreuoeffizient. Die Objektwelle setzt sich aus der Summe aller gestreuten Wellen zusammen, wobei der Faktor 2 im exponentiellen Anteil der Objektwelle durch den Hin- und Rückweg entsteht. Auf dem Detektor werden die jeweiligen von Referenz- und Objektarm zurückreflektierten Anteile kohärent überlagert. Dabei wird vom Detektor die Strahlungsintensität

$$I(k) = \gamma (|R(k)|^2 + |O(k)|^2 + 2\Re(R(k)^* O(k))) \quad 2.29$$

erfasst. \Re steht für den Realteil und γ ist ein Faktor, der die Effizienz des Detektors beschreibt. Die gemessene Intensität setzt sich aus drei Termen zusammen:

$$\begin{aligned} I(k) = & \gamma S(k) A_R^2 && \text{(Gleichanteil)} \\ & + \gamma S(k) A_O^2 \int \int \eta(z) \eta(z') e^{ik2(z-z')} dz dz' && \text{(Autokorrelation)} \\ & + \gamma S(k) 2\Re(A_R A_O \int \eta(z') e^{ik2z'} dz') && \text{(Kreuzkorrelation)} \end{aligned} \quad 2.30$$

$S(k)$ ist das Betragsquadrat von $A_c(k)$ und entspricht der spektralen Intensitätsverteilung der verwendeten Lichtquelle. Der Gleichanteil (DC) ist ein weglängenunabhängiger Untergrund. Er ergibt sich aus dem Spektrum der Lichtquelle und dem Leistungsreflexionsvermögen des Referenzspiegels. Der Gleichanteil ist meist die größte Komponente, da die Referenzreflektivität üblicherweise wesentlich größer ist als die Objektreflektivität. In OCT-Geräten wird dieser Term ohne Einfluss von Probenlicht bestimmt und vom gemessenen Signal subtrahiert oder bei Swept-Source basierter OCT mittels Subtraktion zweier gegenphasiger Signale (balanced detection) eliminiert [48]. Der Autokorrelations-Anteil repräsentiert die auftretende Interferenz zwischen den einzelnen Probenreflexionen in verschiedenen Tiefen und erscheint als Artefakt in den OCT-Bildern. Da die Autokorrelation von dem Produkt der Leistungsreflektivität der Probe abhängt, wird sie durch die heterodyne Verstärkung bei der Signalerzeugung vergleichsweise niedrig gehalten. In homogen streuenden Gewebe nimmt der Anteil des Autokorrelierten-Signals kontinuierlich von der Zero-Delay-Line ab. Der für die OCT-Bildgebung wichtige Anteil ist der Kreuzkorrelations-Term, da er Informationen über in der Tiefe liegende Strukturen enthält. Dieser hängt sowohl von der Kreiswellenzahl k , der Lichtquelle, als auch von der Weglängendifferenz z zwischen dem Referenzarm und den Probenreflektoren ab. Da der Kreuzkorrelationstermin proportional zum Amplitudenstreukoeffizienten ist, ist er typischerweise kleiner als die DC-Komponente. Nach inverser Fourier-Transformation des detektierten Interferenzsignals $I(k)$ kann der A-Scan $I(z)$ rekonstruiert werden:

2.31

$$\mathcal{F}^{-1}[I(k)] = I(z) = \gamma \hat{S}(z') A_R^2 \hat{S}(z') \quad (\text{a})$$

$$+ \gamma \hat{S}(z') A_0^2 * \mathcal{F}^{-1} \left[\int \int \eta(z') \eta(z) e^{ik2(z-z')} dz dz' \right] \quad (\text{b})$$

$$+ \gamma \hat{S}(z') A_R A_0 * \left(\eta \left(\frac{z'}{2} \right) + \eta \left(-\frac{z'}{2} \right) \right) \quad (\text{c})$$

Der erste Term des fouriertransformierten Signals in Gleichung 2.31 enthält die Fourier-Transformation des Leistungsspektrums der Lichtquelle $\hat{S}(z')$. Dieser in den Rohdaten des A-Scans enthaltene niedrigfrequente Anteil zeigt sich durch einen relativ hohen

Signalpeak bei $z = 0$. Er kann durch eine Hochpassfilterung aus dem OCT-Signal entfernt werden. Term (b) enthält die Autokorrelierte der Streuverteilung η . Die Information über die Probe ergibt sich aus der Fourier-Transformation des Kreuzkorrelationsanteils (c). In diesem sind die tiefenabhängigen Streukoeffizienten $\eta\left(\frac{z'}{2}\right)$ und $\eta\left(-\frac{z'}{2}\right)$ gefaltet mit der Fouriertransformierten spektralen Form der Lichtquelle und skaliert mit Objekt- und Referenzwellenamplitude enthalten. Die positiven und negativen Laufzeitdifferenzen ergeben sich aus der Symmetrie der Fourier-Transformation einer reellen Funktion. Ein Vorteil der FD-OCT ist die Messung eines komplexen OCT-Signals, welche sowohl die Amplitude, als auch eine Phaseninformation des zurückgestreuten Lichtes enthält. Eine schematische Darstellung der Signalrekonstruktion eines A-Scans ist in Abbildung 6 nach [48] dargestellt.

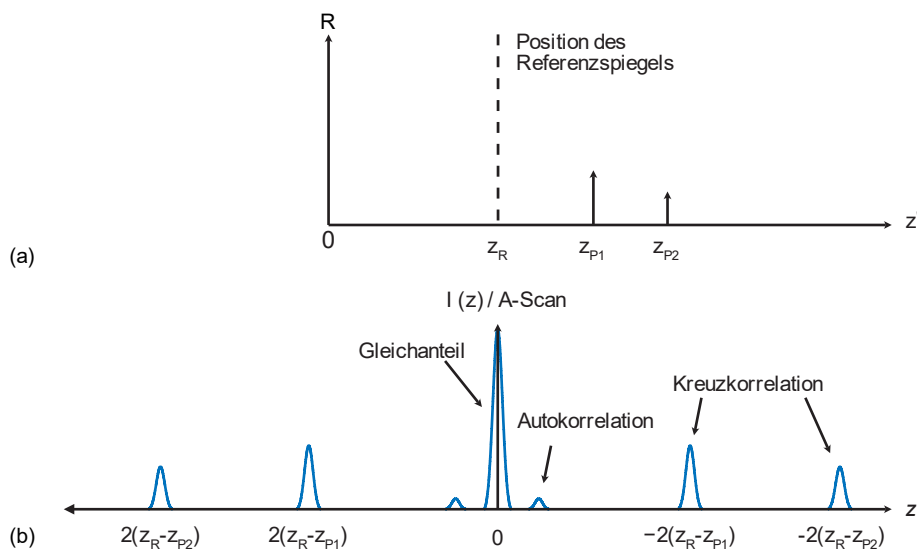


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines A-Scans in der FD-OCT (a) Zwei reflektierende Schichten (Delta-Impulse) in verschiedenen Tiefen z_p und mit jeweils unterschiedlicher Reflektivität $\eta(z')$. (b) Nach einer Fourier-Transformation erscheinen Autokorrelations-, Gleich- (DC) und Kreuzkorrelationsanteil im A-Scan. Die Form der Impulse im A-Scan ergibt sich aus der Fourier-Transformation des Spektrums der Lichtquelle.

Dispersion

Die für die OCT eingesetzte breitbandigen Strahlung wird durch chromatische Dispersion in optisch dichteren Materialien wie beispielsweise Glas oder Wasser beeinflusst. Die Gruppengeschwindigkeit des Lichtes hängt von Brechungsindex $n(k)$ des Materials ab, in dem sich Licht ausbreitet. Durch Dispersion breiten sich die verschiedenen spektralen Anteile des Lichts unterschiedlich schnell aus. Dispersion hat in der auf Interferometrie beruhenden OCT nur dann einen Einfluss, wenn sich die Dispersion in Objekt- und

Referenzarm unterscheidet. Ungleiche Dispersion verbreitert die Kohärenzfunktion und verringert die OCT-Signalamplitude. Um die Dispersion in den beiden Armen anzugleichen, kann beispielsweise Glas in einen der beiden Strahlengänge eingebracht werden. Der Einfluss von Dispersion auf die Phase $\phi(k)$ des Lichtes kann durch eine Taylor-Reihenentwicklung beschrieben werden:

$$\begin{aligned}
 T(\phi(k; k_0)) &= \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \left. \frac{\partial^n \phi(k)}{\partial k^n} \right|_{k_0} & 2.32 \\
 &= \phi(k_0) \\
 &\quad + \left. \frac{\partial \phi(k)}{\partial k} \right|_{k=k_0} (k - k_0) \\
 &\quad + \frac{1}{2} \left. \frac{\partial^2 \phi(k)}{\partial^2 k} \right|_{k=k_0} (k - k_0)^2 + \dots
 \end{aligned}$$

Mit k_0 als zentrale Kreiswellenzahl, wobei $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$ gilt. Der erste Term beschreibt eine globale Phasenänderung, der zweite Term eine Verschiebung des A-Scans (Gruppengeschwindigkeit) entlang der Tiefe. Der dritte Term stellt die Dispersion zweiter Ordnung (Gruppengeschwindigkeitsdispersion) dar [61], welcher zur Verschlechterung der axialen Auflösung führt.

Rauschquellen

Das in der OCT gemessene interferometrische Signal unterliegt einem Rauschen σ_{noise}^2 , welches sich aus unterschiedlichen Rauschquellen zusammensetzt. Im Folgenden wird vollständig linear polarisierte Strahlung angenommen. Die Rauschanteile können in Auslese- und Dunkelrauschen (engl. read out noise & dark noise, $\sigma_{read+dark}$), Schrotrauschen (engl. shot noise, σ_{shot}) und Überschussrauschen (engl. excess noise, σ_{ex}) unterteilt werden und sind maßgeblich abhängig von der verwendeten Lichtquelle und

$$\sigma_{noise}^2 = \sigma_{read+dark}^2 + \sigma_{shot}^2 + \sigma_{ex}^2 \quad 2.33$$

dem Detektor.

Ausleserauschen und Dunkelrauschen $\sigma_{read+dark}^2$ entstehen am Detektor. Dunkelrauschen, bedingt durch spontane Bildung von freien Ladungsträgern durch

Wärme, ist proportional zur Wurzel der Belichtungszeit am Detektor [62]. Als Ausleserauschen werden alle Rauschquellen zusammengefasst, die bei der Digitalisierung des analogen Signals entstehen. Das Schrotrauschen σ_{shot}^2 ist bedingt durch die Quantelung des Lichts in Photonen. Aufgrund der Quantisierung wird auch bei konstantem Strahlungsfluss einer idealen monochromatischen Strahlungsquelle nicht ein konstanter Photonenfluss detektiert. Die Signalschwankungen können über eine Poisson-Verteilung beschrieben werden, deren Varianz gleich dem Mittelwert ist. Im Fall von Superkontinuum-Lichtquellen entspricht das Überschussrauschen σ_{ex}^2 dem relativen Intensitätsrauschen (engl. relative intensity noise, RIN) durch die Puls-zu-Puls Intensitätsschwankungen der Lichtquelle. Der Einfluss des RIN durch den Einsatz von Superkontinuum-Lichtquellen beeinflusst die Bildqualität, da in der Praxis das Überschussrauschen gegenüber dem Schrotrauschen nicht mehr vernachlässigbar ist. RIN skaliert mit der Wurzel der Lichtleistung [63]. Das durch Superkontinuum-Lichtquellen verursachte zusätzliche Überschussrauschen (RIN) zeigt sich nach der Fourier-Transformation des gemessenen Signals als erhöhter Rauschuntergrund [64].

Rekonstruktion in der SD-OCT

In der SD-OCT wird ein A-Scan $I(k)$ üblicherweise annähernd linear zur Wellenlänge und damit nicht-linear zur Kreiswellenzahl k mit einem Spektrometer aufgezeichnet [65]. Um ein in k lineares Signal zu erhalten, müssen die am Spektrometer detektierten Daten auf einen äquidistanten Abstand im k -Raum interpoliert werden.

Neben der direkten Umrechnung von Wellenlänge zu Kreiswellenzahl ($\lambda \rightarrow k$) unter Berücksichtigung der Gittergleichung [66] können auch verschiedene Kalibriermethoden verwendet werden. Beispielsweise kann über eine automatisierte Kalibrierung [67] oder eine Kurzzeit-Fourier-Transformation (engl. short-time Fourier transform, STFT) [68] der $\lambda \rightarrow k$ Vektor für die Interpolation berechnet werden. Die Bestimmung des $\lambda \rightarrow k$ Korrekturvektors wird bei der Kalibrierung des Spektrometers einmalig durchgeführt und kann für alle nachfolgenden Messung wiederverwendet werden.

Zur Reduktion des Rauschens und Entfernung des Gleichanteils können in der SD-OCT verschiedene numerische Vorverarbeitungsschritte genutzt werden, die im Folgendem erläutert werden.

Um den Einfluss des Gleichanteils bei der Rekonstruktion zu minimieren, wird in der SD-OCT ein Signal am Spektrometer ohne Licht aufgezeichnet und von den aufgezeichneten Rohdaten eines A-Scans subtrahiert. Nach Entfernung des Dunkelstroms kann durch eine Hochpassfilterung oder ein ohne Probenlicht aufgezeichnetes Signal des Lichts aus dem Referenzarm der Gleichanteil (DC) aus dem Signal entfernt werden.

In den folgenden Prozessierungsschritten erfolgt die Dispersionskorrektur, Apodisation, Fensterung und Linearisierung des Signals. Wie aus Gleichung 2.31 ersichtlich, wird das gemessene Signal mit der Fouriertransformierten des Spektrums der Lichtquelle gefaltet. Da das gemessene Spektrum endlich ist, können nach der Fourier-Transformation Seitenbänder entstehen, die durch eine geeignete Filterung minimiert werden können. In der OCT wird der Vorgang der Minimierung der Seitenbänder, Unterdrückung von Reflexionen im Aufbau sowie der Kompensation von ungleichmäßiger Empfindlichkeit der Pixel als Apodisierung bezeichnet. In der SD-OCT wird für die Apodisation das Referenzspektrum durch das Blockieren des Probenarms und Aufzeichnen der Intensität des Referenzarmlichts ermittelt. Ein gemessenes Interferenzsignal wird bei der Rekonstruktion durch das Referenzspektrum geteilt und anschließend mit einer geeigneten Fensterfunktion multipliziert. Der Apodisierungsschritt umfasst damit auch die Korrektur des zum Ausleserauschen zugehörigen Fixed-Pattern Rauschens, d. h. der Schwankungen der Intensitäten einzelner Pixel bei gleichmäßiger Beleuchtung.

Anschließend erfolgt eine Interpolation der Daten mit dem für das Spektrometer ermittelten $\lambda \rightarrow k$ Vektor. Insbesondere im Bereich von axial hochauflösenden OCT Systemen ist eine Kompensation der Dispersion zur Erreichung der maximalen Auflösung unabdingbar [69]. Diese kann entweder durch geeignete Wahl von technischen Komponenten [70] oder einer numerischen Nachprozessierung kompensiert werden [71]. Bei einer numerischen Nachbearbeitung werden die A-Scan Rohdaten um eine Phase komplex erweitert, um die inhärente Probendispersion und den Dispersionsunterschied zwischen Objekt- und Referenzarm bestmöglich korrigiert. Dies erfolgt über eine Multiplikation mit einem Phasenterm, der unter Optimierung der axialen Auflösung durch iterative Anpassung bestimmt werden kann [71]. Durch eine darauffolgende Fourier-Transformation wird der A-Scan $I(z)$ rekonstruiert. In Abbildung 7 sind die

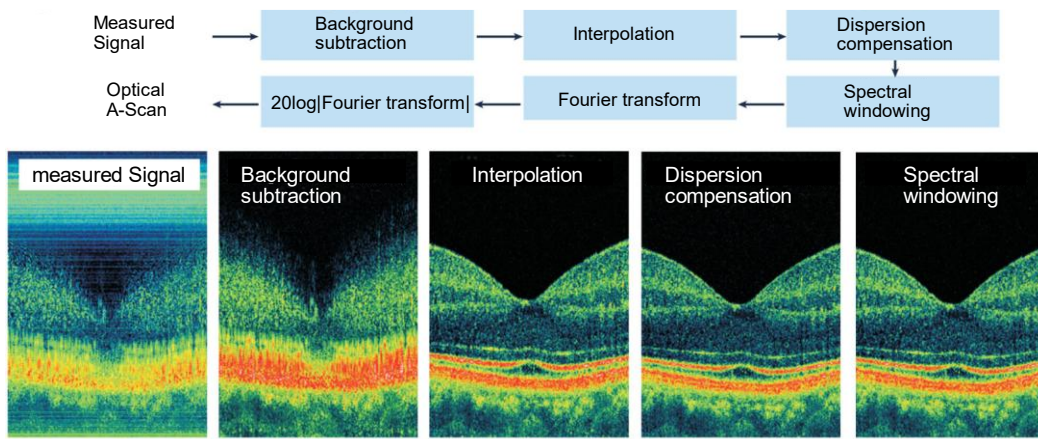


Abbildung 7: OCT-Signalrekonstruktion - Background subtraction: Die Subtraktion von Gleichanteil und Dunkelsignal wird auf das Rohsignal angewandt, um das Hintergrundsignal zu entfernen. Interpolation: Die $\lambda \rightarrow k$ Interpolation sorgt für eine Linearisierung des Signals im k -Raum. Dispersion compensation: Die numerische Dispersionskorrektur optimiert die axiale Auflösung. Spectral windowing: Die Fensterung wird durchgeführt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu maximieren und die Breite der axialen PSF zu minimieren. Fourier transform: Die anschließende Fourier-Transformation rekonstruiert den A-Scan und der Dynamikbereich des Signals wird für die Darstellung logarithmiert. In der unteren Bildreihe sind Ergebnisse der Fourier-Transformation des Signals zu unterschiedlichen Schritten bei der Prozessierung und deren Auswirkungen dargestellt. Nachgedruckt mit Genehmigung von [50] © Springer Nature

grundlegenden Schritte der OCT-Prozessierung und deren Auswirkungen während der Rohdatenprozessierung dargestellt.

Technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung

In der OCT werden verschiedene Parameter für die technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung erhoben, die im Folgenden in einzelnen Abschnitten erläutert werden.

Axiale Auflösung

In der Literatur wird die axiale Auflösung in der OCT häufig unter Annahme eines gaußförmigen Spektrums der Lichtquelle durch die Kohärenzlänge angegeben. Die Fourier-Transformation eines gaußförmigen Spektrum

$$g_{\sigma}(k) = \exp\left(-\frac{k^2}{2 \cdot \sigma^2}\right) \quad 2.34$$

mit der Halbwertsbreite $k_{FWHM} = 2\sqrt{2 \cdot \ln(2)} \cdot \sigma$, ergibt sich als

$$\mathcal{F}[g_{\sigma}(k)] = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \sigma \exp\left(-\frac{z^2}{2\left(\frac{1}{\sigma}\right)^2}\right) \quad 2.35$$

mit der Halbwertsbreite (engl. full width at half maximum, FWHM) $x_{FWHM} = 2\sqrt{2\ln(2)}\frac{1}{\sigma}$. Da zusätzlich der Hin- und Rückweg des Lichts berücksichtigt werden muss, kann die axiale Auflösung $\Delta(z)$ in der FD-OCT durch

$$\Delta_{\text{Gauss}}(z) = 4 \cdot \ln(2) \cdot \frac{1}{k_{FWHM}} \quad 2.36$$

abgeschätzt werden. Nach Ableitung der Kreiswellenzahl nach der Wellenlänge $\frac{dk}{d\lambda} = -\frac{2\pi d\lambda}{\lambda^2}$ ergibt sich die in der Literatur häufig genutzte Formel

$$\Delta_{\text{Gauss}}(z) = 2 \cdot \ln(2) \frac{\lambda_0^2}{\pi \Delta\lambda}, \quad 2.37$$

die die axiale Auflösung in Abhängigkeit der Zentralwellenlänge λ_0 und der spektralen Breite $\Delta\lambda$ des Lichts angibt [72]. In der SD-OCT ist die axiale Auflösung durch die Apodisation, d. h. durch die Fensterfunktion bestimmt. Unter Annahme einer Hann-Fensterung kann die axiale Auflösung nach

$$\Delta_{\text{Hann}}(z) = \pm \frac{4\pi}{K} = \pm \frac{4\pi}{k_{min} - k_{max}} \quad 2.38$$

mit K als spektrale Breite der Lichtquelle berechnet werden. Sie entspricht dem doppelten Pixelabstand [73].

Signal-Rausch-Verhältnis

Aus Gleichung 2.31 ergibt sich, dass der signaltragende Anteil im OCT-Signal dem Realteil des Kreuzkorreliertenanteils am Detektor entspricht. Dieser wird spektral über den gesamten Detektor aufgezeichnet. Die Amplitude des detektierten Signals wird zur Linearisierung quadriert und kann nach der Fourier-Transformation über

$$S_{SD-OCT} = \frac{\eta_{QE}^2 e^2 P_{Ref} P_{Probe} \tau^2}{E_v^2} \quad 2.39$$

beschrieben werden [48]. η_{QE} ist die Quanteneffizienz des Detektors, e die Elementarladung, P_{Ref} und P_{Probe} die Referenz- beziehungsweise Objektarmleistung am Detektor von der Probe, τ die Belichtungszeit des Detektors und $E_v = \frac{hc}{\lambda}$ die

Photonenenergie mit dem Planck'schen Wirkungsquantum h , der Lichtgeschwindigkeit c und Wellenlänge λ .

Signal-Rausch-Verhältnis: Das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio, SNR) ist allgemein definiert als Verhältnis der Leistung des Signals I zur Rauschleistung σ . In der OCT wird das SNR als Quotient der mittleren Leistung zur mittleren Rauschleistung angegeben

$$SNR_{SD-OCT} = \frac{S_{SD-OCT}}{\sigma_{noise}^2} \quad 2.40$$

Das SNR wird in der Literatur häufig in logarithmischer Form angegeben: $SNR = 20 \log_{10} \left(\frac{S_{SD-OCT}}{\sigma_{noise}^2} \right)$. Ein optimales SNR wird erreicht, wenn das Schrotrauschen dominiert, welches mit der Wurzel des Signals zunimmt. Unter Annahme, dass die Referenzlichtleistung wesentlich größer ist als das zurückgestreute Licht von der Probe gilt für das Auslese- und Dunkelrauschen:

$$\frac{\eta_{QE} e^2 P_{ref} \tau}{E_v} > \sigma_{r+d}^2 \quad 2.41$$

In diesem Fall ergibt sich für das SNR:

$$SNR_{SD-OCT} = \frac{\eta_{QE} P_{Probe} \tau}{E_v} \quad 2.42$$

Verbesserung des SNR durch Mittelung: Um die Bildqualität zu verbessern, kann eine Steigerung des SNR durch Mittelung erzielt werden [74]. In der OCT kann kohärente von inkohärenter Mittelung gesondert unterschieden werden. Mittelung bezieht sich auf die Mittelung von entweder räumlich benachbarten Pixeln oder von mehreren zeitlich aufeinander folgenden OCT-Messungen. Bei inkohärenter Mittelung über die Zeit wird nur der Betrag des OCT-Signals gemittelt. Der mittlere Signalpegel bleibt erhalten, jedoch nimmt die Varianz des Rauschens um den Faktor $\frac{1}{N}$ ab. Kohärente Mittelung kann in gleicher Weise zur Mittelung des komplexen Signals von zeitlich aufeinanderfolgenden Pixeln genutzt werden. Es bezieht die Phase des komplexen Signals mit ein. Da der Phasor in einem Pixel ohne Signal zufällig fluktuiert, führt die komplexe Mittelung (kohärente Mittelung) zu einer Abnahme der mittleren Intensität des Rauschens um $\frac{1}{N}$ und bei der

Varianz um $\frac{1}{N^2}$. Im Gegensatz zur inkohärenten Mittelung werden auch die Mittelwerte von Signal und Rauschen beeinflusst. Bei kohärenter Mittelung nimmt die mittlere Intensität des Rauschens ab, was effektiv zu einer Steigerung des SNR führt [75].

Sensitivität & Dynamikbereich

Sensitivität: Aus dem SNR abgeleitet kann die Sensitivität des Systems theoretisch bestimmt werden. Die Sensitivität definiert sich über die minimal messbare Probenreflektivität R_{min} , bei der das SNR einen Wert von 1 annimmt [76] und somit das Signal dem Rauschniveau entspricht:

Die Sensitivität wird in der Literatur üblicherweise in logarithmischer Darstellung angegeben und hängt im Falle der Dominanz des Schrotrauschens nur von der Quanteneffizienz, der Probenbestrahlung, der Belichtungszeit und der Photonenenergie ab [77]:

$$Sensitivität_{SD-OCT} = 10 \log_{10} \left(\frac{1}{R_{min}} \right) = 10 \log_{10} \left(\frac{\eta_{QE} P_{Probe} \tau_i}{E_v} \right) \quad 2.43$$

Roll-Off: In FD-OCT Systemen nimmt die Sensitivität in der Regel mit der Messtiefe ab. Die Abtastung der spektralen Interferogramme bestimmt die spektrale Auflösung und damit die Messtiefe. Die endliche Breite der Pixel auf dem Zeilendetektor reduziert den Kontrast hochfrequenter Modulationen. Deshalb nimmt die Amplitude des rekonstruierten Signals bei höheren Frequenzen ab. Dieser in der SD-OCT auftretende Effekt wird als Roll-Off (auch Fall-Off) bezeichnet und ist maßgeblich abhängig vom verwendeten Spektrometer [78].

Dynamikbereich: Der Dynamikbereich in der OCT beschreibt das Verhältnis von maximal messbaren zu minimal detektierbaren OCT-Signal und ist bei der SD-OCT von der Sättigungskapazität (engl. full well capacity, FWC), der Pixelanzahl N und dem Rauschen des Detektors abhängig [79, 80]. Das minimal messbare Signal entspricht dem Rauschniveau, welches sich aus Auslese- und Schrotrauschen zusammensetzt. Eine volle Modulation des OCT-Signals als maximal messbares Signal wird erreicht, wenn die FWC des Detektors zu jeweils $\frac{1}{4}$ durch Referenz- und Objektarm gesättigt wird (siehe Gleichung 2.30). Der Dynamikbereich kann dann über

$$DR_{SD-OCT} = 20 \left(\log_{10} \left(\frac{FWC}{8} \cdot \sqrt{N} \right) - \log_{10} \left(\sqrt{\sigma_{r+d}^2 + \frac{FWC}{4}} \right) \right) \quad 2.44$$

abgeschätzt werden [81], wobei N der Anzahl der Pixel am Detektor entspricht.

Detektion

Scanning OCT

Die bisher vorgestellten Verfahren zur optischen Kohärenztomografie messen wie beim Ultraschall, zuerst die Tiefenabhängigkeit, was auch als A-Scan $I(z)$ (Amplituden-Scan) bezeichnet wird. Um eine laterale Abhängigkeit der Streuung der Probe entlang einer Achse zu bestimmen, können beispielsweise auslenkbare Spiegel wie galvanometrische Spiegel oder MEMS-Scanner zur Strahlableitung eingesetzt werden. Diese Variante der OCT wird auch als flying spot OCT bezeichnet. Durch die sich bei der scannenden OCT ergebende konfokale Anregung und Detektion wird der Einfluss von mehrfachgestreuten Photonen auf die Signalakquisition minimiert. Konfokale Bildgebung nutzt eine Lochblende, um bei der optischen Abbildung Licht, welches nicht aus einem mit einem fokussierten Laserstrahl beleuchteten Bereich stammt, abzuschwächen. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt. Eine mathematische Beschreibung dieses Prinzips findet sich in [82]. Konfokale Bildgebung trägt zu einer Tiefendiskriminierung in der Mikroskopie bei. In der scannenden OCT entsteht die konfokale Bildgebung durch die

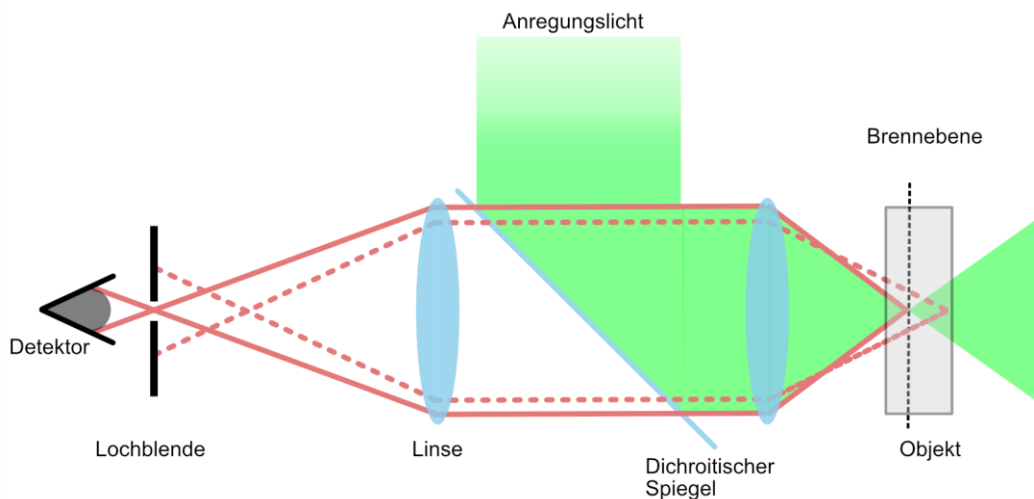


Abbildung 8: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips - Licht, welches nicht aus dem Brennpunkt stammt, wird im Bereich der Lochblende geblockt. Dies optimiert die axiale als auch laterale Auflösung und führt zu einer zusätzlichen Tiefendiskriminierung.

Verwendung von Single-Mode Fasern. Die Tiefe $\Delta_{konfokal}z$ des konfokalen Gatings in der scannenden OCT mit Single-Mode Fasern folgt aus der Theorie der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie [82], mit

$$\Delta_{konfokal}(z) = \frac{0,63 \cdot \lambda_0}{n(1 - \cos(\alpha))} \quad 2.45$$

wobei α der halbe Öffnungswinkel des einfallendes Lichts ist. Allgemein wird in der OCT die Beschreibung der lateralen Auflösung aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie übernommen [83, 84], die gegenüber dem Rayleigh-Kriterium um $\sqrt{2}$ gesteigert ist:

$$\Delta_{konfokal}(x, y) = 0,37 \cdot \frac{\lambda_0}{NA} \quad 2.46$$

Line-Field OCT

Line-Field OCT (LF-OCT) ist ein Ansatz zur parallelen Detektion von A-Scans entlang einer Achse, um den wesentlichen Nachteil des sequenziellen Scannens in der scanning OCT zu überwinden [85]. LF-OCT beruht auf der Verwendung von Zylinderlinsen, um einen Lichtschnitt in die Tiefe zu projizieren. Line-Field-Konzepte wurden als TD-OCT [86] und FD-OCT Variante [87] gezeigt.

Full-Field OCT

Flächensensoren ermöglichen die parallele Detektion einer en face Ebene (Full-Field OCT, FF-OCT) [88, 89]. Erste Ansätze wurden bereits 2002 als FF-TD-OCT Aufbauten veröffentlicht [90]. Im Gegensatz zu scannenden FD-OCT Verfahren muss für die Akquirierung eines Volumens durch die Tiefe gescannt werden [91], dargestellt in Abbildung 9 nach [91]. FF-FD-OCT Varianten sind dagegen in ihrer Umsetzung aufwendiger, aber deutlich schneller. Erste Konzepte in der FF-FD-OCT wurden als FF-SS-OCT Aufbauten realisiert [92]. Diese detektieren jeweils während eines Lasersweeps einer durchstimmbaren Lichtquelle 100 bis 1000 Interferogramme bei verschiedenen Wellenlängen und können somit ein Volumen innerhalb weniger Millisekunden akquirieren, schematisch dargestellt in Abbildung 9 (c). Somit konnte eine im Vergleich zu bisherigen Verfahren sehr schnelle Variante von OCT realisiert werden. Hierbei werden Voxel Akquisitionsraten im GHz Bereich erreicht [93]. Beispielsweise konnte mittels eines Full-Field Swept-Source Ansatzes A-Scan-Raten im MHz Bereich zur Darstellung der Retina *in vivo* umgesetzt werden [94, 95].

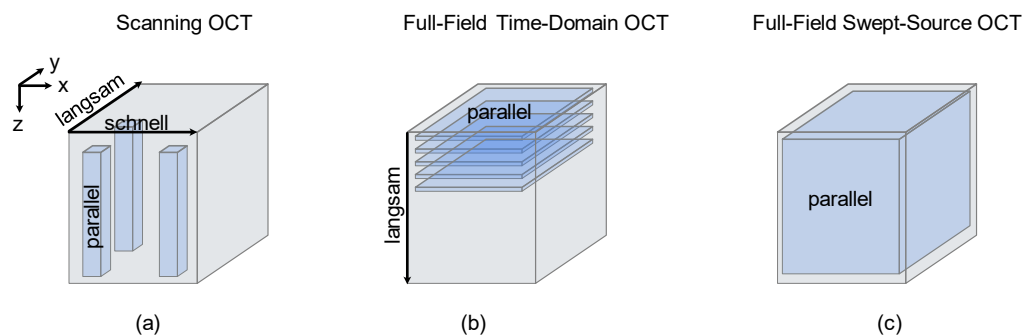


Abbildung 9: Gegenüberstellung von scannender OCT zu Full-Field OCT. (a) Durch die parallele Aufnahme von A-Scans in der scanning (auch flying spot) (FD-)OCT können B-Scans innerhalb weniger Millisekunden aufgezeichnet werden. Volumenaufnahmen benötigen typischerweise mehrere Sekunden bis Minuten. (b) In der Full-Field Time-Domain OCT können en face Ebenen durch die Parallelisierung bei der Detektion innerhalb weniger Mikrosekunden aufgezeichnet werden. Für Volumenaufnahmen muss entlang der Tiefe gescannt werden, was die Messzeit erhöht. (c) Full-Field Swept-Source OCT ermöglicht durch die Kombination aus paralleler Detektion und Swept-Source Ansatz die Aufzeichnung ganzer Volumen innerhalb weniger Millisekunden.

2.3.3 Anwendungsfelder in der OCT

Durch die Möglichkeit der hochaufgelösten Darstellung der Retina ist OCT zum Goldstandard bei der Diagnose verschiedenster Erkrankungen wie beispielsweise altersbedingter Makuladegeneration geworden und hat sich dadurch im Bereich der Ophthalmologie als Standardbildgebungstechnik für die Retina etabliert [96]. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der OCT können diese Informationen *in vivo* am Patienten gewonnen werden. In den letzten 25 Jahren hat sich die OCT dabei immer weiter differenziert. Hauptgegenstand der Forschung bestand in der Erhöhung von Auflösung und der Steigerung der Messgeschwindigkeit, in der Erschließung neuer funktioneller Bildgebungstechniken und der Etablierung neuer Anwendungsfelder neben der Ophthalmologie. Zu neueren Bereichen, bei der die OCT für verschiedene Anwendungen evaluiert wird, zählen Kardiologie, Dermatologie und Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde [97]. Zu den Forschungsfeldern der funktionellen Erweiterung der OCT zählt die Untersuchung der Änderung der Polarisierung des gestreuten Lichtes, Modulation in der optischen Frequenz durch den Doppler-Effekt und phasensensitive Bildgebung. Diese dienen beispielsweise dazu, die tiefenaufgelöste Extinktion [98], Blutflussgeschwindigkeit [99], Änderung von Doppelbrechung und Reflektivität des Gewebes bei neuronaler Aktivität zu bestimmen [48].

Funktionaler Kontrast

An dieser Stelle werden ausschließlich zwei funktionelle Erweiterungen der OCT zur Darstellung von Gewebepfusion näher beschrieben.

Doppler OCT: Basierend auf dem Doppler-Effekt kann die Flussgeschwindigkeit über die induzierte Doppler-Frequenzverschiebung $\Delta\omega$ im zurückreflektierten Licht entlang der optischen Achse in jeder Tiefenposition bestimmt werden [100]. In der FD-OCT wird die Doppler-Frequenzverschiebung des komplexen OCT-Signals über die Phase ausgewertet. Dabei werden die axialen Bewegungen in der Probe aus den Phasendifferenzen $\Delta\phi$ zweier um die Zeit versetzten A-Scans über

$$\Delta z(x, z) = \frac{\lambda_0 \Delta\phi(x, z,)}{4n\pi T} \quad 2.47$$

berechnet. T ist die Zeit zwischen den Aufnahmen und $\Delta\phi$ die Phasendifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden A-Scans. Phasenbasierte Doppler-OCT misst nur die axiale Bewegungskomponente und ist darüber hinaus durch Bewegungsartefakte und der Abhängigkeit der Phasensensitivität vom SNR für *in vivo* Anwendungen limitiert [101].

Speckle-Varianz OCT: Bei der Speckle-Varianz OCT werden A-Scans bzw. B-Scans oder Volumen über die Zeit mehrmals aufgezeichnet [102, 103]. Durch Berechnung der Varianz des Betragsanteils des OCT-Signals über die Zeit können statische von dynamischen Signalen unterschieden werden. Eine Hauptanwendung hat sich dabei in der Detektion von Blutgefäßen ergeben. Diese Technik wird in der Literatur als Optische Kohärenzangiographie bezeichnet (Optical Coherence Tomography Angiography, OCTA). Aufgrund der hohen Auflösung in der OCT konnte eine mikroangiografische Bildgebung realisiert werden, bei der Blutgefäße bis hin zu Kapillaren dargestellt und deren Verteilung *in vivo* evaluiert werden [104]. Dieser Ansatz ermöglicht zudem eine volumetrische Blutflussdarstellung [105, 106]. Ein Nachteil in der OCT ist die höhere Sensitivität gegenüber Bewegungsartefakten, die mit einer reduzierten Qualität der OCTA-Bilder einhergehen [107].

2.3.4 Hochauflösende OCT

OCT-Aufbauten, die entweder eine besonders hohe axiale bzw. laterale Auflösung bieten, werden entweder als high-resolution OCT oder als Optical Coherence Microscopy (OCM) bezeichnet [108, 109]. Zur Steigerung der axialen Auflösungen werden häufig Superkontinuum-Lichtquellen, Femtosekundenlaser oder mehrere Superlumineszenzdiode im Multiplexverfahren eingesetzt [20, 44, 110]. Um eine hohe laterale Auflösung zu ermöglichen, werden Objektive mit einer hohen numerischen Apertur verwendet. Ein sich daraus resultierender Nachteil ist die geringere Rayleighlänge, wodurch nur noch Strukturen in einer begrenzten Messtiefe um den Fokus herum scharf dargestellt werden.

In den letzten Jahren wurden verschiedene sowohl axial als auch lateral hochauflösende scanning SD-OCT Systeme unter den Bezeichnungen μ OCT [111, 112], visOCM [113], microscopic OCT [114] und mOCT [19] veröffentlicht. Diese Systeme erreichen nahezu $1\ \mu\text{m}^3$ isotrope Auflösung und unterscheiden sich hauptsächlich in der Art der

Fokusverlängerung, um den Nachteil hoher NA Objektive auszugleichen. μ OCT nutzt einen apodisierten Probenstrahl und visOCM einen Bessel-Strahl zur Fokusverlängerung. In der microscopic OCT wird eine akusto-optische Linse eingesetzt, um den Fokus über mehrere Aufnahmen axial zu verschieben und durch Stitching der Fokusebenen nachträglich eine künstliche Fokusverlängerung in den rekonstruierten Bildern zu erzeugen. Dieser Ansatz wird auch in der Gabor-Domain OCM verfolgt [115]. Unter der Bedingung einer phasenstarrten Aufnahme bietet die OCT darüber hinaus auch die Möglichkeit zur nachträglichen Refokussierung der Daten, da bei der kohärenten Bildgebung neben der Amplitude auch die Phase gemessen wird [116]. In einem numerischen Nachbearbeitungsschritt konnte mittels mOCT gezeigt werden, dass Aberrationen und Defokus korrigiert werden können [117]. In der LF-FD-OCT wurde die höchste axiale Auflösung mit $1,22 \mu\text{m}$ bei einer Empfindlichkeit von 89 dB und einer lateralen Auflösung von $26 \mu\text{m}$ eines parallelen SD-OCT-Systems von der Arbeitsgruppe um A. Wax veröffentlicht [118]. Die Arbeitsgruppe um A. Oldenburg veröffentlichte einen LF-SD-OCT Aufbau mit 1.024.000 A-Scans/s bei einer Auflösung von 2 (axial) bzw. $14 \mu\text{m}$ (transversal) und einer Empfindlichkeit von 113 dB [119]. Neben hochauflösender SD-OCT wurden auch in der TD-OCT Aufbauten entwickelt, die isotrope Auflösungen im Bereich von $1 \mu\text{m}^3$ erreichen. Diese wurden sowohl als LF-TD-OCT und FF-TD-OCT veröffentlicht [86, 90, 120]. Derzeit wird in der klinischen Anwendung der Nutzen von hochauflösender FF-TD-OCT für histologische Untersuchungen *ex vivo* evaluiert [121].

Bildgebung der Atemwege

Ein Ziel der Auflösungssteigerung in der OCT ist die Darstellung von Zellen und subzellulären Strukturen [122]. Mittels hochauflösender OCT konnte beispielsweise im Gegensatz zur 2-Photonen Mikroskopie die Funktion von Zilien-tragenden Zellen *ex vivo* und *in vivo* ohne Anfärbung untersucht werden [19, 21, 112, 123, 124]. Als Zilie wird eine besondere Form des Zellfortsatzes bezeichnet, welche eine essenzielle Funktion beim Schleimtransport in den Atemwegen innehat. Diese mehrere Mikrometer langen Strukturen enthalten neben Zytoplasma ein röhrenförmiges Skelett aus Bündeln von Mikrotubuli, welches auch als Axonem bezeichnet wird. Störungen dieser Bewegungen und der Zilien-tragenden Zellen können Atemwegserkrankungen hervorrufen [125].

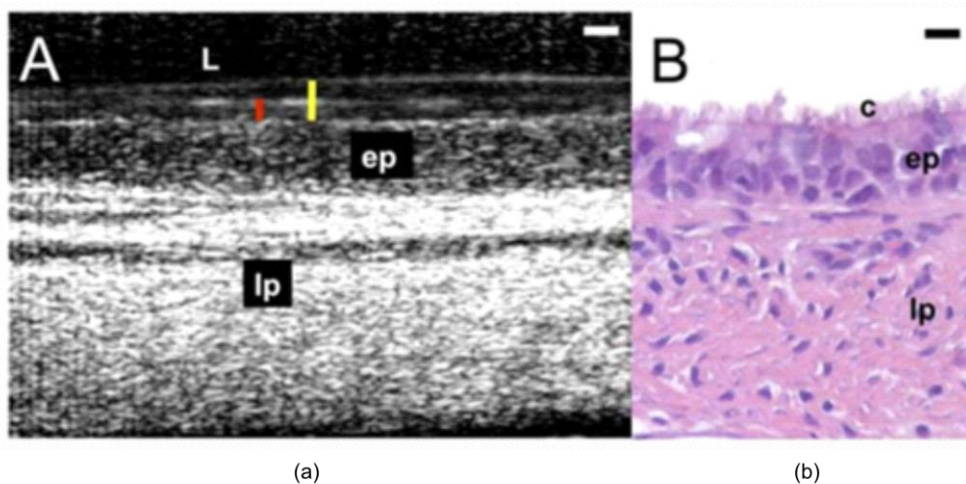


Abbildung 10: μ OCT-Aufnahme einer exzidierten Luftröhre des Schweines. (a) μ OCT B-Scan. Gelber Balken: Tiefe der Atemwegsflächenflüssigkeit; Rote Balken: Tiefe der perikiliären Flüssigkeitsschicht; Epithel (ep) und Lamina propria (lp) sind ebenfalls sichtbar. (b). H&E-geläutertes Histologiebild mit Darstellung der Zilien (c), des Epithels (ep) und der Lamina propria (lp). Maßstabsbalken: 10 μ m. Nachgedruckt mit Genehmigung von [112] © PLOS.

In Abbildung 10 ist ein B-Scan eines μ OCT-Setups mit korrespondierenden HE-Schnitt einer Schweineluftröhre *ex vivo* dargestellt. Anhand des B-Scans können verschiedene Schichten der Luftröhre vom Schwein unterschieden werden. Die Epithelschicht (ep) lässt sich von der Lamina propria (lp) durch die Grauwertunterschiede abgrenzen. Im Gegensatz zu einem histologischen Schnitt können aufgrund von Speckle keine einzelne Epithelzellen im B-Scan identifiziert werden.

Speckle

Ein in der OCT auftretendes Problem ist das bei kohärenter Bildgebung entstehende Speckle-Phänomen, welches sich wie ein Rauschen mit hohem Kontrast auf die Bildgebung auswirkt und die Darstellung von zellulären Strukturen erschwert. Speckle entstehen in der OCT durch Streuung an Strukturen in der Probe, die kleiner sind als die Punktspreizfunktion (engl. point spread function, PSF) [3]. Sie verschlechtern die Bildqualität und erschweren die Differenzierung von Strukturen nahe der beugungsbegrenzten Auflösung. Trotz seines räumlich zufälligen Aussehens wird das Speckle-Muster einer Probe vollständig durch die zugrunde liegende räumliche Verteilung der Streuer bestimmt [126]. In der Vergangenheit wurden verschiedene Verfahren zur Minimierung der Bildartefakte durch Speckle entwickelt. Unter der Bedingung, dass während einer Messung das Speckle-Muster über mehrere zeitlich konsekutive OCT-Aufnahmen unkorreliert ist, kann eine Mittelung eine Reduktion des

Speckle-Kontrastes herbeiführen. Ein sich dabei ergebender Nachteil kann die gleichzeitige Verschlechterung der Auflösung sein, falls die Voxel in den Aufnahmen nicht mehr miteinander korreliert sind. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anwendung von Mittelwert- oder Median-Filtern auf benachbarte Voxel in einem Nachprozessierungs-Schritt, welche gleichzeitig zu einer Auflösungsreduktion führt. Darüber hinaus existieren auch aufwendigere Bildverarbeitungsfilter, wie nichtlineare Schwellwert-Filterung, nichtlineare anisotrope Filterung oder neuronale Netzwerke, welche aber künstliche Strukturen in den Bildern erzeugen können [127]. Zur Darstellung von zellulären Strukturen sind diese Verfahren aufgrund der Auflösungsreduktion nur bedingt geeignet. Ein weiteres Verfahren zur Optimierung des Speckle-Kontrastes unter Beibehaltung der Auflösung wurde unter der Bezeichnung SM-OCT (Speckle-Modulation) vorgestellt [128]. Mit Hilfe eines optischen Diffusors werden lokale zufällige Phasenänderungen im Objektlicht induziert. Dies erzeugt ein unkorreliertes Speckle-Muster in den OCT-Bildern und nach inkohärenter Mittelung über die Zeit zu einer Verringerung der Speckle. Unter der Bezeichnung temporal speckle averaging (TSA) wurde eine Methode vorgestellt, bei der eine Reduktion der Speckle *in vivo* bei der Aufnahme der Netzhaut durch Registrierung und Mittelung von mehreren aufgenommenen Volumina möglich ist [126].

2.3.5 Bewegung als Kontrast in der OCT

Neben den Verfahren zur Reduktion von Speckle-Artefakten und ausgehend von den in 2.3.3 vorgestellten funktionalen Erweiterungen der OCT existieren noch weitere Methoden, um die dynamischen Signalfluktuationen von Zellen im OCT-Signal zu untersuchen. Bei der Bildgebung von lebenden Zellen und Geweben kommt es zu Veränderungen im Speckle-Muster, die auf die Bewegung von streuenden Strukturen zurückzuführen sind. Neben dem Vorhandensein von roten Blutkörperchen, die im Gefäßsystem fließen, kann die Bewegung von Streuern im Gewebe durch intrazelluläre Bewegung verursacht werden. Die Untersuchung des Signalfluktuationen in Gewebe über den Blutfluss hinaus wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Beispiele hierfür sind die Bewegung von Organellen entlang von Mikrotubuli, der Prozess der Mitose und die mit der Apoptose verbundenen morphologischen Veränderungen. Während der Apoptose führt eine vorhersehbare Abfolge von

biochemischen und morphologischen Veränderungen zum Zelltod. Beispielsweise wurde unter der Bezeichnung ‚Motility Contrast‘ eine Methode zur Untersuchung der Wirkung von Krebsmedikamenten auf das Zytoskelett veröffentlicht [129]. Über die Auswertung der Standardabweichung im Verhältnis zur mittleren Intensität wurde die Zellmotilität von Sphäroiden nach Medikamentengabe bestimmt. Eine Untersuchung bzgl. der Signalfluktuationen durch Zellmotilitäten von Mammaepithelzellen erfolgte auch durch Oldenburg et al. [130, 131]. Mit den beiden Methoden ‚Motility Amplitude‘ und ‚Speckle Fluctuation Spectroscopic Analysis‘ erfolgte eine Auswertung der Motilität der Zellgewebe anhand der Intensitätsdaten. Die axiale und laterale Auflösung des verwendeten OCT-System betrug $2,6\ \mu\text{m}$ bzw. $10\ \mu\text{m}$ in Luft. Ein weiteres Verfahren wurde unter der Bezeichnung ‚Diffusion Sensitive OCT, vorgestellt, bei dem das Leistungsspektrum der zeitlichen Fluktuationen des OCT-Signals von der Diffusion von Partikel ausgewertet wird [132]. Die dynamische Lichtstreuung (engl. dynamic light scattering, DLS) ist ein Verfahren zur Untersuchung des Diffusionsverhaltens von Makromolekülen in Lösung [133]. In der DLS werden zeitliche Fluktuationen in der Regel anhand der Autokorrelationsfunktion analysiert. Eine schnellere Dynamik von Teilchen führt zu einer schnelleren Dekorrelation der gestreuten Intensität. Dieser Ansatz wurde auch in der OCT umgesetzt, um anhand der Autokorrelation der Intensität an jedem Pixel Apoptose und die Bewegung von intrazellulären Strukturen zu untersuchen [134-137]. Mit einem OCT-System bei einer axialen Auflösung von $14\ \mu\text{m}$ und einer lateralen Auflösung von $18,1\ \mu\text{m}$ in Gewebe wurde von El-Sadek et al. auch unter der Bezeichnung ‚dynamic OCT‘ das dynamische Verhalten von Sphäroiden untersucht [138, 139]. Der Begriff ‚dynamic OCT‘ wird in der Literatur unter anderem auch als Synonym für Speckle-Varianz OCT zur Darstellung von Blutgefäßen (OCTA) genutzt [140]. Des Weiteren wurden mit einem OCT-Systeme bei einer axialen Auflösung von $3\ \mu\text{m}$ und einer lateralen Auflösung von $10\ \mu\text{m}$ das dynamische Verhalten von Zellkulturen über Zeitserien von Volumenaufnahmen untersucht [141]. Mittels hochauflösender FF-TD-OCT [142, 143] gelang der Arbeitsgruppe um Claude Boccara die Etablierung eines Ansatzes zur Darstellung von Zellen und subzellulären Strukturen, welcher ebenfalls unter der Bezeichnung ‚dynamic OCT‘ (dOCT) veröffentlicht [22, 143] wurde. Die Auflösung des FF-TD-OCT Systems liegt im Bereich von $1 - 2\ \mu\text{m}$. Der signalgebende Anteil wird in dieser Methode aus der intrinsischen Dynamik von Zellen und subzellulären Strukturen

gewonnen. In ihren Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe um C. Boccara aufzeigen, dass sich mithilfe von ‚dynamic OCT‘ durch Analyse des Signals in Kombination mit einer hohen Auflösung Zellen und subzelluläre Strukturen kontrastreich *ex vivo* darstellen und damit studieren lassen [144-146]. Aus den interferometrisch erfassten en face Rohdaten-Bildern eines FF-TD-OCT Aufbaus wurde über eine Auswertung der dynamischen Anteile das en face dOCT-Bild erzeugt. Der bei der dOCT erzeugte Kontrast basiert auf der metabolischen Aktivität von Zellen und scheint von ATP abhängig zu sein [147]. Die Bewegungen von Zellen wurde beispielsweise mittels quantitativer Phasenmikroskopie besonders am Beispiel von Erythrozyten eingehend studiert [148]. Hierbei zeigte sich, dass der signaltragende Anteil durch den aktiven Metabolismus von Zellen verursacht wird und mit ATP Verbrauch in Verbindung steht [149]. Dynamische OCT kann daher nur bei *in vivo* und frischen *ex vivo* Proben mit noch lebenden Zellen angewandt werden. Ein Vorteil der dOCT gegenüber anderen Bildgebungsverfahren, wie beispielsweise Fluoreszenzmikroskopie, besteht in der Möglichkeit, zelluläre Strukturen färbungsfrei auflösen zu können. Das FF-TD-OCT System, schematisch dargestellt in Abbildung 11 (a), basiert auf einem Linnik-Interferometer mit einer LED, welche Licht im sichtbaren Bereich emittiert, sowie einem Objektiv mit hoher NA [90]. Durch den Einsatz einer räumlich inkohärenten Lichtquelle haben in diesem Aufbau mehrfach gestreute Photonen

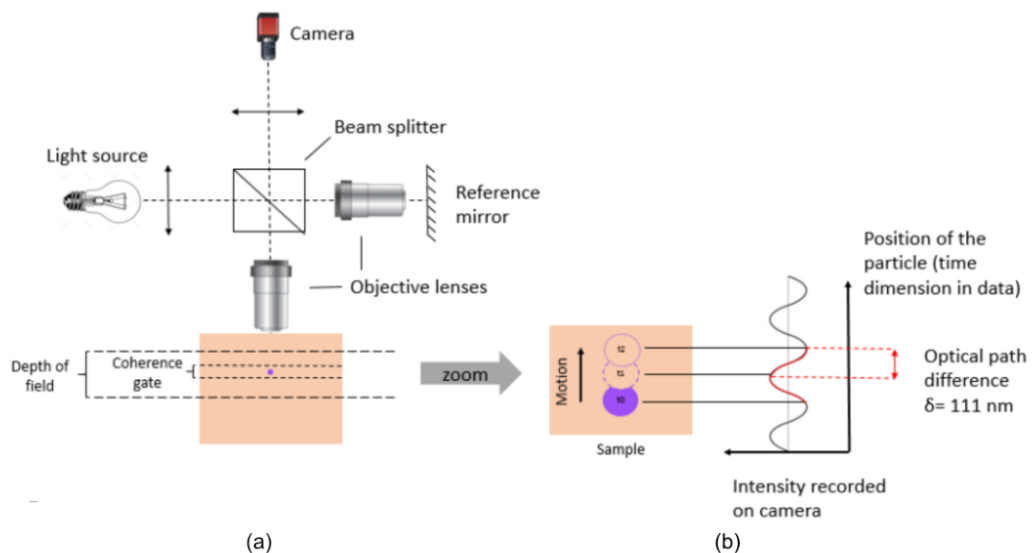


Abbildung 11: Schematische Darstellung des FF-TD-OCT Aufbaus (a) Basierend auf einem Linnik-Interferometer wird mit einer breitbandigen Lichtquelle und einem Objektiv mit einer NA von 0.3 eine isotrope Auflösung von $1 \mu\text{m}^3$ erreicht. Strukturen innerhalb der Kohärenzlänge der Lichtquelle erzeugen das interferometrische Signal. (b) Intrinsische Bewegungen der Probe innerhalb der Kohärenzlänge erzeugen eine messbare Phasenverschiebung. Adaptiert mit Genehmigung von [22] © The Optical Society

(Cross-Talk) keinen negativen Einfluss auf die Bildqualität und es wird eine isotrope Auflösung von $1 \mu\text{m}^3$ erreicht. Unter Verwendung einer Flächenkamera werden die zurückgestreuten Photonen aus einer en face Ebene innerhalb eines Volumens interferometrisch detektiert. Durch Verfahren der Probe oder des gesamten Interferometers entlang der Tiefe z können Volumina aufgenommen werden. In der dynamic OCT werden die zeitlich konsekutiv aufgenommenen en face Ebenen anhand der Signalfuktuationen, siehe Abbildung 11 (b) analysiert. Die detektierte interferometrische Signalintensität $I(r, t)$ am Ort $r = (x, y, z)$ zur Zeit t kann dabei durch

$$I(r, t) = I_0(r) + \alpha(r, t) \cdot \cos(\phi(r, t)) \quad 2.48$$

beschrieben werden. I_0 ist die Intensität des Referenzsignals und beinhaltet auch das Licht, welches sich nicht innerhalb der Kohärenzlänge befindet. α und ϕ sind Amplitude und Phase des zurückgestreuten Lichts aus der Probe, welches mit dem Referenzlicht interferiert. Für die dOCT-Bildgebung wird das Signal über einen längeren Zeitraum detektiert, sodass das statische Signal I_0 vom detektierten Signal I subtrahiert werden kann und ausschließlich der dynamische Signalanteil $\alpha(r, t) \cdot \cos(\phi(r, t))$ verbleibt. Die

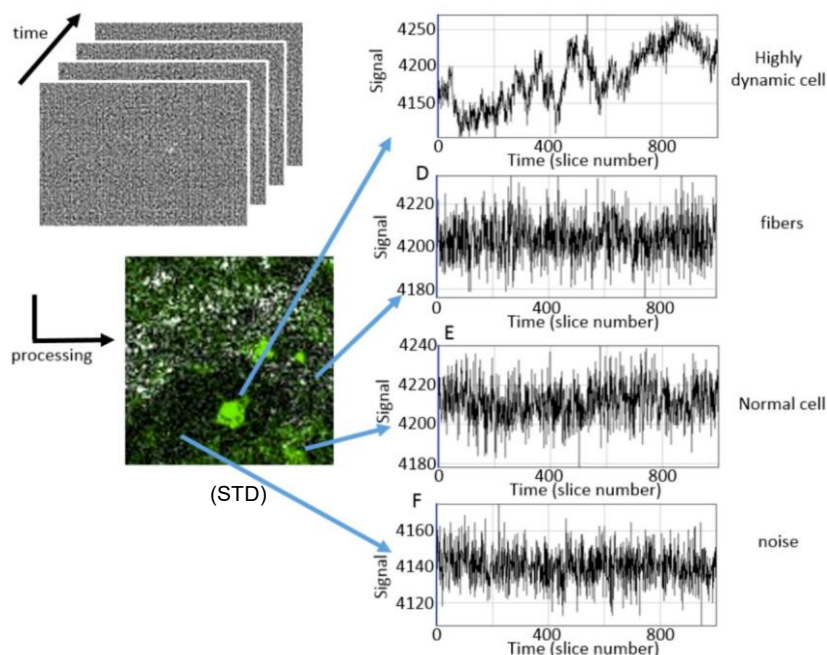


Abbildung 12: OCT mit dynamischen OCT-Kontrast - Aufnahme eines en face Bildstapels über die Zeit mit anschließender Auswertung des zeitlichen Signalverlaufs in vier verschiedenen Regionen des Bildes zeigt unterschiedliche Fluktuationen in Abhängigkeit von der Bildstruktur. Die Analyse der Signalfuktuationen durch die Standardabweichung ermöglicht einen neuen Kontrastmechanismus (STD) in der OCT. Adaptiert mit Genehmigung von [22] © The Optical Society

Amplitude α und die Phase ϕ sind durch die Streuer innerhalb eines Voxel bestimmt und ändern sich abhängig von der Bewegung der Streuer innerhalb des Voxels. Dieser dynamische Signalanteil wird zur Kontrasterzeugung genutzt. Eine Möglichkeit zur Analyse des dynamischen Signals S die auch bei der OCT-Angiographie angewandt wird, ist die Berechnung der Standardabweichung des Signals über einen Zeitraum T (Abbildung 12):

$$I(r, t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^T (S(x, y, t_i) - \langle S(x, y) \rangle)^2} \quad 2.49$$

Aufgrund der langen Messzeiten zur Erfassung der Signale von bis zu einer Sekunde ist die dOCT bisher auf *ex vivo* Untersuchungen eingeschränkt. In ersten Versuchen wird mittels einer Bewegungskorrektur die *in vivo* Anwendbarkeit von FF-TD-OCT und dOCT am Auge erforscht [24]. Die Aufnahmezeit betrug dabei 25 Sekunden. Um das dynamische Signal besser klassifizieren zu können, wurde in weiteren Arbeiten die Darstellung im Frequenzraum mittels eindimensionaler Fourier-Transformation genutzt [150] :

$$\mathcal{F}\{S(t)\}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int S(t) \cdot e^{-i\omega t} \quad 2.50$$

Nach Fourier-Transformation kann das Signal anhand der enthaltenen Frequenzanteile analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Auswertung der zeitlichen Signale in drei unterschiedliche Frequenzbereiche und anschließender Repräsentation im RGB-Raum Zellen und subzelluläre Strukturen kontrastreich voneinander differenziert dargestellt werden können [150]. Dies bietet den Vorteil, dass der spezifisch erzeugte Kontrast direkt auf den Bewegungskomponenten der Zellen basiert [151]. Im Bereich scannender FD-OCT konnten auch mittels visOCT über die Auswertung des komplexen Signals mehrerer B-Scans Zellkerne und Zytoplasma einzelnen Makrophagen in einer Petrischale gezeigt werden [113]. Leung et. al. veröffentlichte erste Ergebnisse mit μ OCT zur dOCT anhand von *ex vivo* Ösophagus- und Zervixgewebe [152]. Dabei erfolgte die Auswertung über die Analyse des Leistungsspektrums der zeitlichen Signalfuktuationen.

3 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt wird der Aufbau zur hochauflösenden SD-OCT beschrieben und elementare technische Bestandteile näher erläutert. Der mikroskopische OCT-Aufbau (mOCT) zeichnet sich durch eine besonders hohe axiale und laterale Auflösung im Bereich von 1 - 2 μm aus. Die zugehörige Ansteuerung, Datenakquisition, Prozessierung der Rohdaten und technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung werden in den darauffolgenden Abschnitten beschrieben. Im anschließenden Abschnitt wird die Implementierung der dOCT für die mOCT und die verwendeten Auswertungsalgorithmen behandelt. Abschließend erfolgt eine Beschreibung der Versuchsdurchführungen.

3.1 Mikroskopische OCT

3.1.1 Aufbau

Der Aufbau zur mikroskopisch optischen Kohärenztomografie basiert auf einem Michelson-Interferometer (Abbildung 13). Als Lichtquelle wird ein Superkontinuum-Laser eingesetzt (SuperK EXTREME - EXW-OCT, NKT Holding, Dänemark). Das von der Lichtquelle emittierte Licht wird über einen Bandpass-Filter und (SuperK SPLIT, NKT

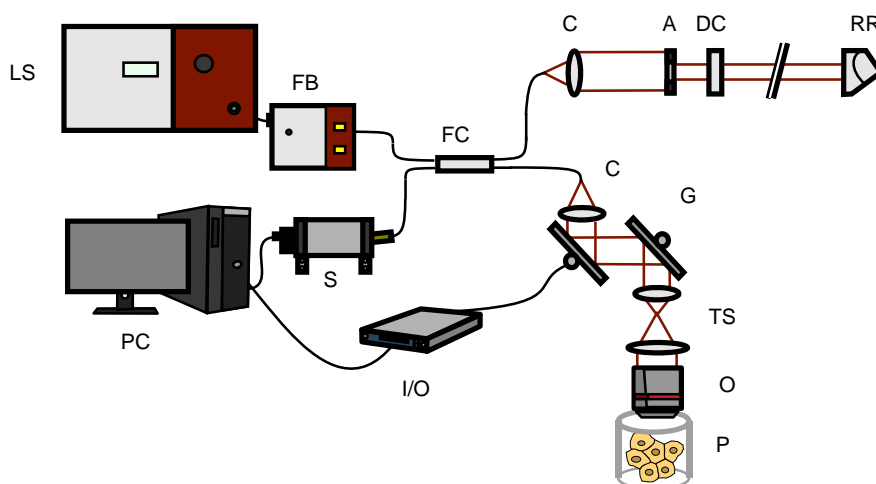


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus zur mikroskopischen OCT - LS: Lichtquelle; FB: Filter; FC: Faserkoppler; PC: Computer; S: Spektrometer; I/O: I/O-Karte; C: Kollimatoren; A: Apertur; DC: Dispersionskorrektur; RR: Retroreflektor; G: galvanometrische Spiegel; TS: Teleskopoptik; O: Objektiv; P: Probe. Das Licht wird in einem Breitband-Faserkoppler in Objekt- und Referenzarm aufgeteilt. Das von der Probe zurückreflektierte Licht interferiert mit dem zurückreflektierten Licht aus dem Referenzarm auf dem Detektor des Spektrometers und wird am PC ausgewertet. Durch Auslenkung der galvanometrischen Scanner wird die Probe in xy abgetastet.

Holding, Dänemark) eine Monomodefaser (630HP, Thorlabs, Inc., USA) zu einem 50/50 Breitband-Faserkoppler (TW630R5A2, Thorlabs, Inc., USA) geleitet.

Ein Teil des Lichts wird im Referenzarm über einen Kollimator (60FC-L-4-M25-02, Schäfter + Kirchhoff GmbH, Germany) ausgekoppelt. Nach Dispersionsausgleich durch 14 mm Glassubstrat (SF57, Casix Inc., China) wird das Licht über einen variablen Abschwächer (NDC-50C-2M, Thorlabs Inc., USA) auf einen Retroreflektor (PS975M-B, Thorlabs Inc., USA) geleitet, um zurück zum Faserkoppler reflektiert zu werden.

Im Objektarm wird ein baugleicher Kollimator verwendet. Das kollimierte Licht wird über zwei galvanometrische Spiegel (6210H, Cambridge Technology, USA) geleitet. Eine Ebene zwischen den Spiegeln wird mittels eines achromatischen Linsensystems (SL50-CLS2 und TL200-CLS2, Thorlabs, Inc., USA) auf die hintere Brennebene des Mikroskopobjektivs abgebildet. In dieser Arbeit wurde ein 10x/0,3 NA Mikroskopobjektiv der Firma Leica eingesetzt (HCX APO L 10x/0.3 WUVI, Leica Microsystems, Deutschland).

Zurückreflektiertes Licht aus Proben- und Referenzarm wird über eine Monomodefaser zurück zum Spektrometer geleitet. Dieses besteht aus ein holografisches Gitter und einer Zeilenkamera zur Detektion des Spektrums. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Spektrometer verwendet.

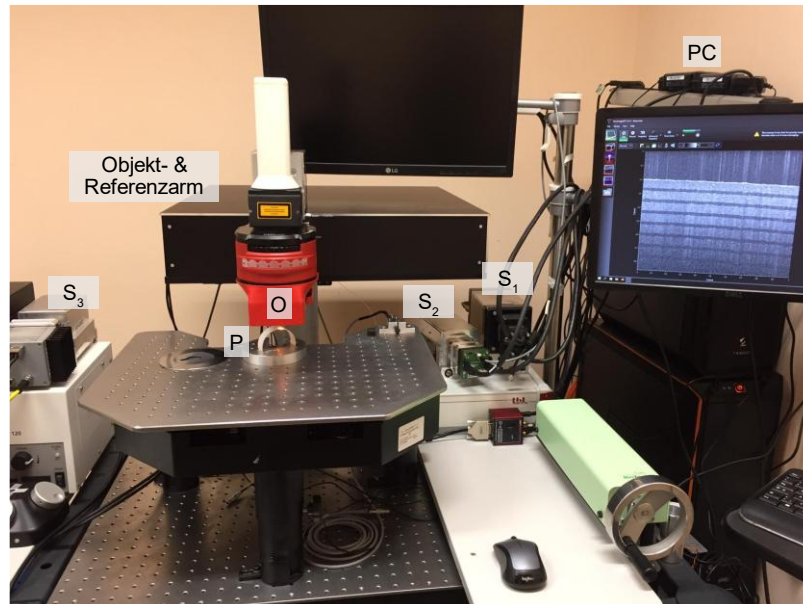


Abbildung 14: mOCT-Aufbau auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Als Messobjekt (P) wurde eine Rolle Klebeband unter das Mikroskopobjektiv (O) positioniert. Die B-Scan Aufnahme mit den unterschiedlichen Schichten des Klebebandes ist auf dem Bildschirm dargestellt. PC: Computer; S₁: Sprint-, S₂: OctoPlus- und S₃: xposure-Spektrometer

Die Ansteuerung der galvanometrischen Scanner erfolgt über zwei Analog-Ausgänge einer I/O-Karte (NI-6251, National Instruments, USA) und einem Treiber. In Abbildung 14 ist der mOCT-Aufbau dargestellt. Die Probenhalterung befinden sich auf einem in zwei Achsen verstellbaren Tisch (Intravital stage, LaVision BioTec GmbH, Deutschland). Um eine größtmögliche Stabilität während einer Messung zu gewährleisten, sind alle Komponenten bis auf Lichtquelle und Spektrometer auf einem aktiv gedämpften optischen Tisch (T1020CK & PTA514, Thorlabs, USA) gelagert. Die Probe kann in xy-Richtung computergesteuert mit Mikrometerpräzision in xy-Richtung verschoben werden. Die Höhe des Tisches kann hydraulisch verändert werden, um die Probe optisch zu fokussieren. Die Anpassung der Messtiefe erfolgt durch Verschiebung des Retroreflektors im Referenzarm. Zur Triggerung des Systems (Kamera und galvanometrische Scanner) wird der Counter-Ausgang der NI-6251 I/O-Karte genutzt.

Spektrometer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Spektrometer mit jeweils drei verschiedenen Zeilenkameras verwendet, die sich hauptsächlich bezüglich

Tabelle 1: Wichtigste Kenndaten der im mOCT verwendeten Zeilenkameras

	Sprint SpL4096 140km	OctoPlus CL	xposure monochrome
Hersteller	Basler AG, Deutschland	Teledyne e2v, USA	Austrian Institute of Technology, Österreich
FWC [e ⁻]	18.000	200.000	13.000
Quanteneffizienz	37 % @ 750 nm	54 % @ 850 nm 41 % @ 590 nm	42 % @ 463 nm 43 % @ 518 nm 43 % @ 627 nm 24 % @ 860 nm
$\sigma_{\text{dark+read}}$ [e ⁻]	26	55	25
Pixelanzahl	2048	2048	2016 (+32 inaktive)
Ausleserate [Hz]	127.000	248.000	600.000
Digitalisierung [bit]	8	12	10
Pixelgröße [μm^2]	10 x 10	10 x 200	9 x 9

Auslesefrequenz (A-Scan-Rate) und Sättigungskapazität unterscheiden. Tabelle 1 listet die wichtigsten Eigenschaften der Spektrometer, bzw. der darin befindlichen Zeilenkameras auf [153-155]. Die beiden Zeilenkameras Sprint spl4096 140km (Basler AG, Deutschland) und OctoPlus CL (Teledyne e2v, Vereinigtes Königreich) werden in kommerziellen OCT-Systemen der Firma Thorlabs verbaut. Der Datentransfer erfolgte über eine CameraLink Schnittstelle mit einer Frame-Grabber Karte am PC. Die Zeilenkamera xposure monochrome (AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Österreich) wurde für eine schnelle volumetrische Bildgebung evaluiert. Sie besitzt 2016 aktive und 32 inaktive Pixel mit einer Pixelgröße von $9 \times 9 \mu\text{m}^2$ bei einem 90 % Füllfaktor. Der Hersteller gibt nach EMVA 1288 [156] eine über 4 Wellenlängen gemittelte Quanteneffizienz von 37 % und eine Sättigungskapazität von 13.000 e^- an [155]. Zur Datenübertragung wird eine optische GigE Schnittstelle (Generic Compatible 40G QSFP+ to 4x10G SFP+ Breakout Active Optical Cable, Fiberstore, USA) verwendet. Um die Daten zu prozessieren wurde ein leistungsstarker Computer eingesetzt (i9 7900X CPU, Intel, USA und Gigabyte X299 Aorus 9 Mainboard, Gigabyte Technology, USA). Die xposure-Zeilenkamera überträgt die Daten an eine Intel Netzwerkkarte X520-SR2 (Intel® Ethernet Converged Network Adapter X520-SR2, Intel, USA). Für die Teledyne e2v ergibt sich eine Übertragungsrate von 0,95 GByte/s (12 Bit) und für die xposure-Zeilenkamera 1,14 GByte/s (8 Bit). Für eine Volumenaufnahme werden die Rohdaten der xposure-Zeilenkamera auf eine M.2 SSD (Samsung 960 Pro M.2 2280) gespeichert.

3.1.2 Ansteuerung & Datenakquisition

Für die Basler Sprint- und die OctoPlus-Zeilenkamera konnte die kommerzielle Software ThorImage 5.2 (Thorlabs, USA) zur Ansteuerung und Visualisierung der OCT-Daten während einer Messung verwendet werden. Diese bietet in verschiedenen Modi die Möglichkeit A-Scans, B-Scans, Volumen und Speckle-Varianz Aufnahmen abzuspeichern. Im Speckle-Varianz Aufnahmemodus kann die Anzahl an B-Scans, die hintereinander am selben Ort aufgezeichnet werden sollen, das Messfenster und die Anzahl an nebeneinanderliegenden B-Scans eingestellt werden. Nach jeder Aufnahme von mehreren B-Scans wird die Aufnahme orthogonal zum B-Scan verschoben und es wird erneut die Anzahl an vorgegebenen B-Scans aufgezeichnet. Aus den sequenziell aufgezeichneten B-Scans wird die Varianz über die Zeit berechnet und somit ein

Speckle-Varianz Volumen erzeugt. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit auch das Software Development Kit (SDK) von ThorImage verwendet. Dieses wurde in eine LabVIEW Software eingebunden, um Zeitserien von dmOCT B-Scans mit der Basler Sprint- und OctoPlus-Zeilenkamera aufzuzeichnen. Hierbei werden über einen vom Nutzer vorgegeben Zeitintervall dmOCT B-Scan Aufnahmen aufgezeichnet.

3.1.3 Prozessierung der Rohdaten

In der scannenden SD-OCT wird das tiefenabhängige eindimensionale Streuprofil (A-Scan) aus den aufgenommenen spektralen Intensitäten mithilfe einer Fourier-Transformation rekonstruiert. Um die dabei bestmögliche axiale Auflösung zu erreichen, bedarf es mehrerer Vorverarbeitungsschritte, um unter anderem den Einfluss von probeninhärenter Dispersion zu minimieren [73]. Das Rekonstruktionsverfahren ist in einer Matlab Software implementiert. Größere Datenmengen konnten auch in einem Batch-Prozess prozessiert werden.

$\lambda \rightarrow k$: Zur Korrektur der spektral aufgezeichneten Daten wird am Spektrometer ein dispersionsfreies Signal aufgenommen. Ohne Licht aus dem Referenzarm wird ein Silberspiegel am Ende des 50/50 Faserkopplers positioniert, sodass ein dispersionsfreies Autokorrelationssignal des Silberspiegels detektiert werden kann. Anhand dieses dispersionsfreien Signals wurde der $\lambda \rightarrow k$ Vektor über eine Kurzzeit-Fourier-Transformation bestimmt [73].

Korrektur des Dunkelsignals: Vor dem Start einer Messung wird ein Signal der Kamera ohne Licht aufgenommen und abgespeichert, sodass in den A-Scans einer darauffolgenden Messung das Dunkelrauschen von allen Spektren subtrahiert wird.

Apodisierung: Anschließend werden die Rohdaten durch einen vor (xposure) oder während (OctoPlus/Thorlabs) der Messung aufgenommenes Referenzspektrum dividiert und mit einem Hann-Fenster multipliziert.

$\lambda \rightarrow k$: Die Rohdaten werden anhand des bei der Kalibrierung aufgezeichneten $\lambda \rightarrow k$ Vektors über eine Spline-Interpolation linearisiert.

Dispersionskorrektur: Um die Dispersion in den Daten zu minimieren, wird ein Nelder-Mead Optimierungsalgorithmus [157] verwendet, der anhand der

Shannon-Entropie in einer von Benutzer ausgewählten ROI des Betrags eines OCT-Bildes die Elemente des Polynoms $f(k)$ bis hin zur einer vom Benutzer vorgegebenen Toleranzgrenze optimiert.

$$f(k) = d_0 + d_1 \cdot k + d_2 \cdot k^2 + d_3 \cdot k^3 + \dots$$

Die Koeffizienten $d \in \mathbb{R}$ werden bezüglich des Maximums von $(-\sum I(z) \cdot \log_2(I(z)))$ optimiert. k entspricht der Kreiswellenzahl. Da d_0 der globalen Phasenänderung und d_1 einer Verschiebung des A-Scans in die Tiefe z entspricht, werden diese Parameter nicht optimiert und auf Null gesetzt. $I(z)$ sind die Beträge des OCT-Signals in einer vom Benutzer vorgegebenen Region im OCT-Bild [117, 158]. Die Phasenfunktion wird mit der komplexen Erweiterung des Spektrums multipliziert.

Hochpassfilterung: Der in den Rohdaten des A-Scans enthaltene DC-Anteil, der sich durch einen relativ hohen Signalpeak im Bereich der Zero-Delay-Linie darstellt, wird durch eine Hochpassfilterung in den Rohdaten aus dem OCT-Signal entfernt.

FFT: Im letzten Prozessierungsschritt werden der apodisierte A-Scan durch eine Fourier-Transformation umgewandelt, um den komplexen linearen OCT A-Scan zu rekonstruieren.

Visualisierung: Zur Visualisierung der OCT-Daten wird der Betrag der komplexen linearen OCT-Daten in eine logarithmische Darstellung überführt.

3.1.4 Technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung

Axiale Auflösung

Die Bestimmung der axialen Auflösung erfolgte über die Messung an einem Silberspiegel (PF0511-P01, Thorlabs, USA). Das OCT-Signal wurde bei maximal möglicher Aussteuerung des Spektrometers und bei 10 % der maximalen Messtiefe aufgenommen. Nach Dispersionskorrektur wurde eine Gaußfunktion für die Werte des Betrags des linearen OCT-Signals und die axiale Auflösung über die Halbwertsbreite der Gaußfunktion bestimmt.

Roll-Off

Zur Bestimmung des Roll-Off wurde das OCT-Signal bei maximaler Aussteuerung des Spektrometers und anschließender Optimierung der Dispersion über bis zu 10 äquidistante Messpunkte durch Verschiebung der Referenzarmstrecke entlang der gesamten Messtiefe gemessen. Als Messobjekt wurde ein Silberspiegel verwendet.

Dynamikbereich

Der Dynamikbereich wurde aus den Messwerten der Roll-Off Messung bestimmt. Aus der Differenz des maximal ausgesteuerten OCT-Signals zum mittleren Rauschniveau wurde der Dynamikbereich der Spektrometer berechnet.

Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurde das OCT-Signal der dielektrischen Oberfläche eines Keilprismas mit definierter Reflektivität $R_{Objekt} = 4,1 \cdot 10^{-2}$ bestimmt [81]. Ein zusätzlicher Grauwertfilter mit einer optischen Dichte $OD = 1,1$ im Strahlengang dient der Vermeidung von Übersteuerung. Die Sensitivität ergibt sich aus dem SNR, Reflektivität der Oberfläche (R_{Obj}) und der Abschwächung des Filters (OD) nach [159] über

$$\text{Sensitivität}_{\text{dB}} = 20 \log_{10} \left(\frac{I_{Obj}}{\sigma} \right) - 10 \log_{10} (R_{Obj}) + 20 OD \quad 3.1$$

Laterale Auflösung

Die laterale Auflösung wurde anhand eines AirForce Target (2" x 2" Positiv, USAF Auflösungsstestbild, hohe Auflösung, Edmund Scientific Corporation, USA) bestimmt. Anhand des en face OCT-Bildes wurde das Element ausgewertet, welches die höchste

Anzahl an Linienpaaren / mm aufweist und zugleich noch auflösbar war. Zudem wurde die Edge-Spread Funktion an der Kante eines optischen Gitters (RR5-25-CG, Applied Image Inc., USA) mit 5 cy/mm gemessen. Aus der Halbwertbreite der Ableitung der Edge-Spread Funktion wurde die laterale Auflösung zusätzlich verifiziert [160].

Bildfeld

Zur Bestimmung des Bildfeldes wurde ein OCT-Volumen eines Gitters (R1L3S3P, Thorlabs, USA) aufgenommen. Anhand der Maximumintensitätsprojektion der Bilddaten entlang der Tiefe z wurden die maximalen Abmaße des Bildfeldes in xy bestimmt.

Strahlungsfluss

Um den auf die Probe einfallenden Strahlungsfluss in Abhängigkeit eines Kontrollparameters zur Einstellung des Ausgangsleistung der Superkontinuumlichtquelle zu bestimmen, wurde ohne Ansteuerung der galvanometrischen Spiegel vor dem Objektiv mit einem thermischen Leistungsmesskopf (S401C & PM100D, Thorlabs, USA) der Strahlungsfluss bei 0 % bis 100 % des Leistungskontrollparameters der Lichtquelle in 10 % Schritten gemessen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt und anschließend gemittelt (Abbildung 15). Ab einer Grenze von 20 % Ausgangsleistung nimmt der Strahlungsfluss stark nichtlinear bis 60 % Ausgangsleistung zu. Ab 60 % Ausgangsleistung nimmt der Strahlungsfluss annähernd linear zu. Es wurde ein maximaler Strahlungsfluss von 63 mW bei 100 % Ausgangsleistung gemessen.

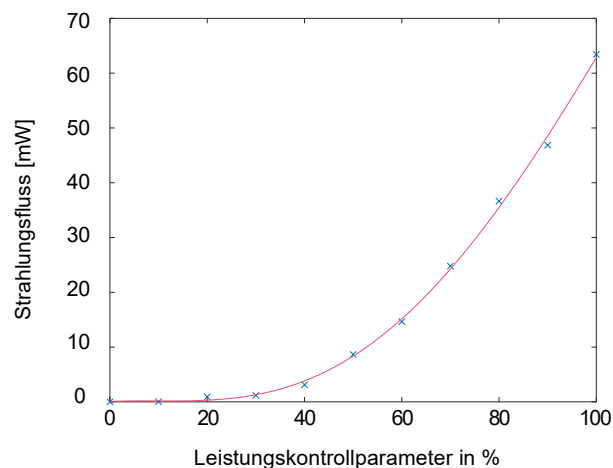


Abbildung 15: Strahlungsfluss auf einer Probe des Leistungskontrollparameters der Superkontinuum-Lichtquelle - Blau: Gemittelte Werte des Strahlungsflusses in Abhängigkeit zur Ausgangsleistung. Rot: Gauß-Fit an die gemessenen Werte. Erst ab 20 % Leistungskontrollparameter wird Strahlung emittiert. Der Strahlungsfluss nimmt ab 60% nahezu linear mit der Ausgangsleistung zu. Es wurde ein maximaler Strahlungsfluss von 63 mW bei 100 % Ausgangsleistung gemessen.

3.2 mOCT mit dynamischen OCT-Kontrast

Die Umsetzung der dynamischen OCT (dOCT) für den mOCT-Aufbau wird im Folgenden als dynamische mOCT (dmOCT) bezeichnet. Die dOCT basiert auf axial und lateral hochauflösender OCT und wertet mehrfache Messungen der Probe über einen spezifischen Zeitraum aus. Eine Voraussetzung für auswertbare Messungen ist eine besonders stabile Messumgebung, damit die Signale nur durch das dynamische Verhalten der Zellen hervorgerufen wird. Vor jeder Messung wurde anhand eines festen Objektes die Stabilität im B-Scan über die Zeit beobachtet und im Falle von Vibrationen wurde die aktive Dämpfung des Tisches geprüft und gegebenenfalls neu justiert. War die aktive Dämpfung des Tisches nicht gewährleistet, konnten minimale Vibrationen im B-Scan im Bereich des Deckglases beobachtet werden, welche die dmOCT Aufnahme beeinflussen würden. Zur Akquirierung von dmOCT Bildern wurden verschiedene Scanmuster zur Erzeugung von dmOCT B-Scans oder Volumen genutzt. Die Aufzeichnung von dmOCT B-Scans erfolgte durch eine zeitliche Aufnahmesequenz von B-Scans. Dynamische mOCT-Volumen konnten dagegen entweder durch eine zeitliche Aufnahmesequenz von B-Scans in Kombination mit einer Rasterung über die y-Achse realisiert werden oder durch die zeitliche Aufnahmesequenz von Volumen. Eine Aufnahme mehrerer nebeneinanderliegender dmOCT B-Scans zur Erzeugung eines dmOCT Volumens über einen Zeitraum mit hoher zeitlicher Abtastung wurde mit der ThorImage Software über den Speckle-Varianz Modus realisiert werden.

3.2.1 Auswertung zur dmOCT

Die OCT-Messdaten wurden mithilfe verschiedener Algorithmen ausgewertet, um dmOCT Bilder zu erzeugen.

Bewegungskorrektur

Da in der dmOCT während der Aufnahme von B-Scans globale Bewegungen die Signalfuktuation der Zellen überlagern und die Bildqualität erheblich einschränken können, wurden translatorische Bewegungen korrigiert. Die Translation zwischen B-Scans wurde mit der Matlab Funktion ‚imregcorr‘ (Matlab Image Processing Toolbox, 2020, USA) anhand des Betragsteils bestimmt [161, 162]. Diese basiert auf der Fourier-Analyse und

nutzt das Fourier-Shift-Theorem zur Bestimmung der Translation [163]. Sie schätzt die Güte der Registrierung über die Kreuzkorrelation zwischen zwei B-Scans.

Da die Phase in den B-Scans äußerst sensitiv gegenüber Bewegungen ist, wurde ein weiterer Algorithmus implementiert, um Phasenfehler zu korrigieren. Über eine Kantensegmentierung [164] wird die Position des Glasplättchens, das über der Probe angebracht ist, in einem bestimmten Bereich bestimmt. Anschließend wird jeweils der zu korrigierende B-Scan über die Multiplikation eines linearen Phasenoffset an die fouriertransformierten Rohdaten über das Fourier-Shift Theorem in axialer Richtung verschoben, sodass die Differenz der Phasen aufeinanderfolgender B-Scans im Bereich des Glasplättchens abnimmt. Mittels Nelder-Mead Optimierungsalgorithmus wird dies so lange wiederholt, bis das Minimum der Phasendifferenz aufeinanderfolgender B-Scans innerhalb eines gewählten Bereiches der Glasplatte gefunden wird.

Standardabweichung (STD)

Für die dmOCT wurden die aufgenommenen OCT-Datensätze an jedem Datenpunkt $S_t(\vec{r})$ des linearen OCT Signals mit $\vec{r} = (z, x)$ (B-Scan) bzw. $\vec{r} = (z, x, y)$ (Volumen) mittels Standardabweichung (STD) über die Zeit ausgewertet:

$$s_t = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum \left(S_{t_i}(\vec{r}) - \bar{S}_t(\vec{r}) \right)^2}, \quad 3.2$$

wobei N der Anzahl aufgenommener OCT-Signale über die Zeit entspricht und $\bar{S}(\vec{r})$ dem Mittelwert über die Zeit. Zur Logarithmierung der Daten wurden diese mit 1 addiert, und entsprechend ihres Minimums und Maximums auf einem Intervall zwischen 0 und 1 normiert.

Frequenzanalyse (FFT)

Als weitere Möglichkeit zur Auswertung der Daten zur dmOCT wurde an jedem Datenpunkt $S_t(\vec{r})$ entlang der Zeitachse eine schnelle Fourier-Transformation berechnet.

$$\tilde{s}_t = \mathcal{F}_t(S_t(\vec{r})) \quad 3.3$$

Das dmOCT Bild wird anschließend als Farbbild aus drei aneinandergrenzende Frequenzbereiche aus dem Spektrum \tilde{s}_t erzeugt [150]. Dies ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt. Langsame Bewegungen im Frequenzbereich von 0 - 0,5 Hz wurden als blau, mittlere Bewegungen bei 0,5 - 5 Hz als grün und schnelle Bewegungen von 5 - 25 Hz als rot in einem RGB-Bild gespeichert. Nach der Fourier-Transformation werden dafür innerhalb der jeweiligen Frequenzgrenzen die Werte aufsummiert. Die Werte werden daraufhin in den drei Frequenzbereichen entsprechend ihres Minimums und Maximums auf einem Intervall zwischen 0 und 1 normiert. Anschließend wurden zu den normierten Werten der einzelnen RGB-Kanäle 1 addiert, um sie logarithmieren zu können. Einzelne dmOCT B-Scans wurden abschließend entsprechend ihres Minimums und Maximums normiert. Die Werte aus den drei Frequenzbereichen wurden dann in den drei Farbkanälen des RGB-Bildes an jedem Pixel abgespeichert. Für die dmOCT Zeitserien musste ein anderer Ansatz gewählt werden, da die Normierung auf einzelne Maxima der einzelnen dmOCT B-Scans der Zeitserie zu einer Schwankung der der Farbintensität in den dOCT B-Scans zueinander führten. Daher wurden alle dmOCT B-Scans auf das Maximum

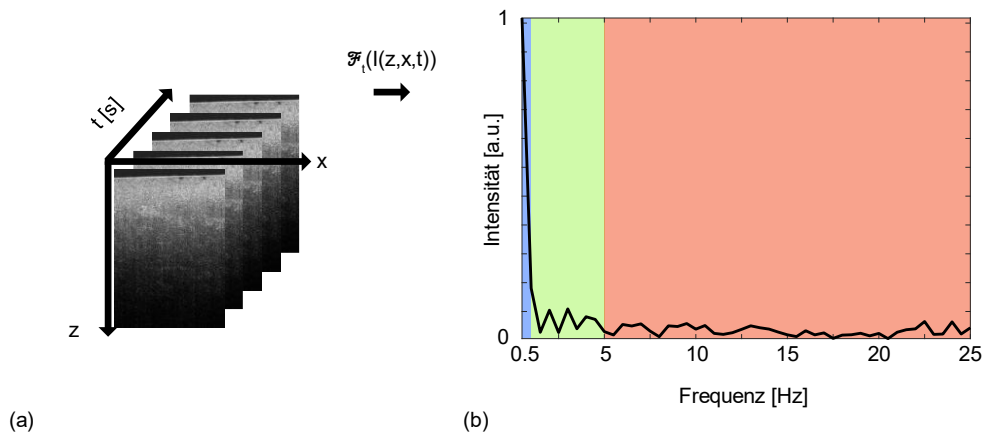


Abbildung 16: Schematische Darstellung der FFT basierten dynamischen OCT-Auswertung (a) Bildfolgen, bestehend aus OCT B-Scans die an derselben Position aufgenommen wurden. (b) Frequenzbasierte Auswertung der OCT Signale. Einteilung unterschiedlicher Bewegungen nach Frequenzbereich in die jeweiligen RGB-Kanäle. Langsame Bewegungen (0 - 0,5 Hz) werden als blau, mittlere Bewegungen (0,5 - 5 Hz) als grün und schnelle Bewegungen (5 - 25 Hz) als rot dargestellt.

aller dmOCT B-Scans normiert. Das gleiche Vorgehen wurde für die dmOCT Volumenaufnahmen durchgeführt.

Aufgrund der konfokalen Eigenschaften der OCT und der Verwendung eines Objektivs mit hoher NA entsteht entlang der Tiefe im OCT-Bild ein Helligkeitsgradient um den Fokus. Je weiter sich Strukturen außerhalb des Fokus befinden, desto weniger Licht wird detektiert und dementsprechend dunkler werden die Strukturen im OCT-Bild dargestellt. Die Helligkeit in den RGB-Bildern wurde für eine bessere Visualisierung um den Fokus in der Tiefe über die Matlab-Funktion ‚brightness‘ reguliert. Dabei wird die Verteilung der Intensität entlang der Tiefe durch Anfitzen einer Gaußfunktion bestimmt. Anschließend werden in einem vorgegebenen Bereich außerhalb der FWHM der Gaußfunktion die Intensitätswerte über eine Eingabe des Benutzers angehoben, sodass die Bereiche außerhalb des Fokus besser sichtbar werden. Zur Visualisierung der dmOCT Bilder wurde Matlab verwendet.

Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Als weitere Methode zur Evaluation der Zelldynamiken wurde die Hauptkomponentenanalyse (engl. principal component analysis, PCA) verwendet. Das mathematisch äquivalente Verfahren Singulärwertzerlegung zur Auswertung der Signalfluktuations wurde erstmals theoretisch von Ammari et al. 2016 [165] für dmOCT vorgestellt. Dafür wurde die Matlab Funktion ‚pca‘ (Matlab Statistics and Machine Learning Toolbox, Matlab 2020, The MathWorks, Inc., USA) genutzt. Die OCT-Daten $I(x, y, z, t)$ wurden dafür in eine $n \times p$ Matrix X umgewandelt, wobei n die Zeitkoordinate t ist und p die Anzahl der Messvariablen xyz bzw. xz (Volumen bzw. B-Scan). Die PCA Analyse der Daten X ist durch

$$T = X \cdot W \quad 3.4$$

gegeben, wobei W die Koeffizientenmatrix und T die PCA-Werte sind. Die Spalten der Koeffizientenmatrix enthalten die Koeffizienten der Hauptkomponente und sind in absteigender Reihenfolge der Komponentenvarianz angeordnet [166]. Nach Umformung der Koeffizientenmatrix W in die ursprüngliche Form xyz wurde die Standardabweichung über die Zeitkoordinate gebildet. Die Daten werden mit 1 addiert, um sie zu logarithmieren und abschließend normiert.

3.2.2 Charakterisierung der dynamischen mOCT

Zur Charakterisierung der dmOCT wurden Messreihen aufgenommen, die im Folgenden beschrieben werden. Dabei wurde das Spektrometer mit der OctoPlus-Zeilenkamera verwendet.

Axiale Auflösung

Um die Abhängigkeit der dmOCT von der axialen Auflösung zu untersuchen, wurden unterschiedliche axiale Auflösungen durch Anpassung der Breite des Hann-Fensters bei der Rekonstruktion simuliert. Aus den simulierten unterschiedlichen axialen Auflösungen wurden dmOCT Bilder generiert und miteinander verglichen.

Kontrast-Rausch-Verhältnis

Das Kontrast-Rausch-Verhältnis (engl. contrast-to-noise ratio, CNR) wurde über die gemittelten ROIs aus 2 Bereichen mit Signal (s) und aus dem Hintergrund (b) eines dmOCT Bildes durch

$$CNR = \frac{\overline{m_s} - \overline{m_b}}{\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_s^2}} \quad 3.5$$

berechnet. $\overline{m_s}$ ist der Mittelwert aus der ROI mit Signal, $\overline{m_b}$ der Mittelwert und σ_b die Standardabweichung aus der ROI ohne Signal und σ_b mit Signal [167]. Um die Abhängigkeit der Messzeit bei der dmOCT auf den Kontrast zu untersuchen, wurde der CNR Wert für unterschiedliche Messdauern eines B-Scan Datensatzes berechnet. Die CNR Werte wurden daraufhin für die in dieser Arbeit verwendeten Auswertungsalgorithmen miteinander verglichen.

3.2.3 FF-TD-OCT

Als Referenzsystem für die Evaluierung der dmOCT wurde das LightCT - ein FF-TD-OCT System - der Firma LLTech Inc. (Frankreich) verwendet (Abbildung 17). Bei einer NA von 0,3 und einer LED Lichtquelle mit einer Bandbreite von 100 nm bei einer zentralen Wellenlänge von 565 nm wird eine isotrope Auflösung von $1 \mu\text{m}^3$ erreicht. Das FF-TD-OCT System detektiert en face Ebenen und ermöglicht durch Verschiebung der Probe oder des Interferometers entlang der optischen Achse Volumenaufnahmen. Die Systemparameter



Abbildung 17: LightCT - Kommerzielles FF-TD-OCT der Firma LLTech Imaging zur optischen Biopsie an ex vivo Gewebe. Das System erfasst en face OCT-Bilder bei einer isotropen Auflösung von $1 \mu\text{m}^3$ und basiert auf einem Linnik-Interferometer. Die Probe wird in einem Probenhalter unter dem Objektiv positioniert und mit einem Immersionsmedium in Kontakt zum Objektiv gebracht. Durch Verschiebung des Interferometers entlang der Tiefe können Volumenaufnahmen aufgezeichnet werden.

sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Das Bildfeld (engl. field of view, FOV) des Systems beträgt $1,24 \times 1,24 \text{ mm}^2$ und wird dabei mit 1440×1440 Pixeln abgetastet. Zur Berechnung von dOCT-Bildern werden 1000 Interferenzbilder bei einer Abtastfrequenz von 300 Hz aufgenommen. Die Aufnahmezeit beträgt in diesem Fall 3,33 s. Zur Fixierung der Probe dient ein mitgelieferter Probenhalter, der die Probe innerhalb des Halters gegen ein Deckglas drückt.

Tabelle 2: Spezifikationen des FF-TD-OCT Aufbaus [144, 168]

Lichtquelle	LED; $\lambda_0 = 565 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 100 \text{ nm}$
Kamera	Q-2A750 (Adimec, Niederlande)
Sensor	CMOSIS CSI2100 (AMS, Österreich)
Pixel	$1440 \times 1440 \text{ px}$
Pixelgröße	$12 \mu\text{m}^2$
Sättigungskapazität	1.6 Me^-
Bildrate	735 Hz
Bittiefe	11
NA	0,3
Axiale Auflösung	$1 \mu\text{m}$
Transversale Auflösung	$1 \mu\text{m}$
FOV	$1,25 \text{ mm} \times 1,25 \text{ mm}$
Interferometertyp	Linnik

3.3 Biologische Proben

Ex vivo Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck im Einklang mit dem deutschen Recht an Leber, Zunge und Trachea *ex vivo* Gewebe von C57BL/6 Mäuse durchgeführt (Aktenzeichen: 1_2016-09-15_König). Das *ex vivo* Gewebe wurde in eine Petri-Schale mit Ringerlösung bei Raumtemperatur überführt. Alle Messungen erfolgten in einem Zeitraum von weniger als 2 Stunden nach Entnahme der Organe. Zur Visualisierung des von den Flimmerhärchen angetriebenen Transports der explantierten Trachea wurden 4,5 µm große Mikropartikel (Dynabeads - CELLlection Biotin-Binder Kit, Dynal Biotech ASA, Norwegen) in die *ex vivo* Gewebekultur hinzugefügt. Für die Messungen wurde das Gewebe, wie in Abbildung 18 dargestellt, mit Ringerlösung in einem speziellen Probenhalter (LLTec Inc., Frankreich) des FF-TD-OCT Aufbau überführt und durch einen Drehmechanismus des Halters leicht gegen ein Deckglas gepresst, sodass eine nahezu vollständige Immobilität des Organs gegeben war. Der Halter mit Gewebe wurden anschließend unter das Objektiv des mOCT-Aufbaus positioniert und ein Immersionsmedium zwischen Deckglas und Objektiv aufgebracht. Anhand des Signals des Deckglases im B-Scan wurde die Stabilität des Aufbaus vor jeder Messung überprüft. Mittels Verschiebung der Probe durch die Intravitalstuge wurde eine geeignete Stelle zur Untersuchung ausgewählt. Für eine Vergleichsmessung zwischen FF-TD-OCT und mOCT wurde der Probenhalter mit einem Deckglas mit Markierung benutzt, anhand dessen eine Messung an exakt der gleichen Struktur in beiden Geräten erfolgte.

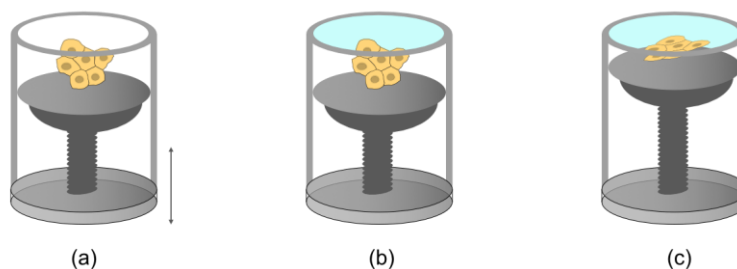


Abbildung 18: Probenhalter mit Probe - Nachdem die Probe im Probenhalter platziert wurde (a), wird das Deckglas (blau) in den oberen Bereich eingebracht (b). Anschließend wird über einen Schraubmechanismus (c) die Probe entlang der Tiefe verfahren, bis sie gegen das Deckglas drückt und somit fest immobilisiert ist.

4 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt wird die Umsetzung der dOCT für scannende SD-OCT mit hoher Auflösung (dmOCT) anhand verschiedener Messungen an *ex vivo* Gewebe einer Maus vorgestellt. Anschließend werden verschiedene Auswertungsalgorithmen für die dmOCT evaluiert. Im zweiten Abschnitt werden die Messungen zur technischen Charakterisierung des mOCT-Aufbaus mit der xposure-Zeilenkamera im Vergleich zur OctoPlus-Zeilenkamera beschrieben. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit realisierten 600 kHz mOCT werden darauf aufbauend anhand von OCT und dmOCT Messungen gezeigt.

Beitrag des Autors

Teile der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sind in vier begutachteten Artikeln publiziert worden [169-172]. In der Promotion von Dr. H. Schulz-Hildebrandt wurde der mOCT-Aufbau mit einer Basler Sprint-Zeilenkamera im Spektrometer verwendet, welches eine axiale Auflösung von $1,3 \mu\text{m}$ erreicht [81]. Die Sprint-Zeilenkamera erlaubte eine maximale A-Scan-Rate von 127 kHz und hatte eine Sättigungskapazität von 18.000 e⁻. In dieser Arbeit wurden zwei neue Spektrometer mit unterschiedlichen Zeilenkameras für den mOCT-Aufbau zur OCT und dmOCT evaluiert. Alle in dieser Arbeit dargestellten Messungen sowie die Auswertung wurden von mir selbstständig durchgeführt. Die Software zur Ansteuerung des mOCT-Aufbaus, die Darstellung von OCT-Daten mit der xposure-Zeilenkamera und eine Auswertungssoftware in Matlab wurden ebenfalls von mir programmiert.

4.1 Auswertung zur dmOCT

Dynamische OCT wurde erstmalig mit einem FF-TD-OCT System gezeigt, dessen axiale und laterale Auflösung im Bereich von $1 \mu\text{m}^3$ liegt. Um die dOCT auf scannender mOCT umzusetzen, wurden die Parameter zum Scannen der Probe angepasst, sodass die notwendige zeitliche Abtastung der Probe als auch die Messdauer gewährleistet war. Die Parameter werden bei den jeweiligen Messungen angegeben. Zusätzlich wurden Algorithmen zur Auswertung der dmOCT am scannenden mOCT-Aufbau entwickelt. In Abbildung 19 ist die GUI der Matlab-Software zur Prozessierung der OCT-Rohdaten dargestellt. Nach Auswahl eines Ordners ‚Select Folder‘ werden die sich darin befindlichen

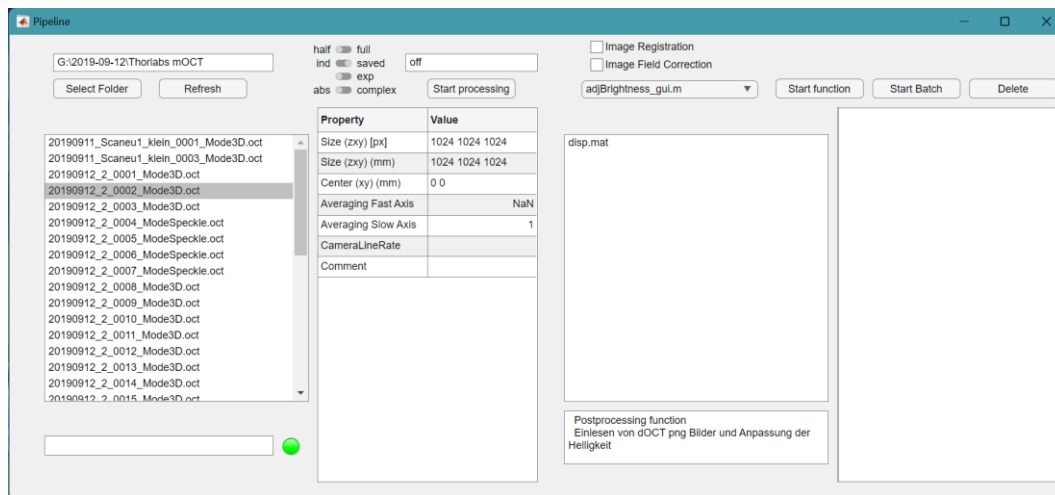


Abbildung 19: Batch-Prozessierungs-Software zur Auswertung der OCT Daten. OCT-Rohdaten können über einen Dialog ‚Select Folder‘ eingelesen werden. Nach Auswahl von Parametern wird die Rekonstruktion über die Schaltfläche ‚Start processing‘ gestartet. Die Weiterverarbeitung der Daten kann über die Schaltfläche ‚Start Function‘ nach Auswahl einer Funktion in der Dropdown-Liste durchgeführt werden.

Rohdatensätze angezeigt. Über die Schaltfläche ‚Start processing‘ kann die OCT-Prozessierung der ausgewählten Rohdatensätze gestartet werden. Die Daten können sowohl mit den in den Datensätzen vorhandenen Dispersionsinformationen oder über eine Funktion zur Optimierung der Dispersionswerte prozessiert werden. Dazu besteht die Möglichkeit die OCT-Daten als komplexen Datentyp oder nur den Betragsanteil im 32 Bit Format ‚single‘ abzuspeichern. Um die Datensätze der Volumenaufnahmen unterhalb einer Stunde prozessieren zu können wurde eine Parallelisierung der OCT-Prozessierung auf CPU-Basis umgesetzt. Die Prozessierung erfolgt parallel auf der CPU über die Matlab Funktion ‚parfeval‘ (Matlab Parallel Computing Toolbox 2020, Mathworks, USA). Diese erlaubte die 4D Volumen und die dmOCT Zeitserienaufnahmen innerhalb von 60 Minuten zu prozessieren.

Auf der rechten Seite (Abbildung 19) können verschiedene Funktionen über eine Dropdown-Liste ausgewählt werden, mit denen die Daten weiterverarbeitet werden können. Beispielsweise kann über die Funktionen ‚dOCT_pca‘ und ‚dOCT_B_Scan‘ eine Auswertung zur dmOCT über den PCA- oder FFT-Algorithmus erfolgen. Über die Schaltfläche ‚Start function‘ werden die OCT-Daten in Abhängigkeit der ausgewählten Funktion der Dropdown-Liste weiterverarbeitet. Dabei kann durch Auswahl einer Bildregistrierung (‚Image Registration‘) jeder Datensatz nach den in 3.2.1 beschriebenen Methoden zur Korrektur von Bewegung vor der Weiterverarbeitung angepasst werden.

4.1.1 FF-TD-OCT / mOCT

Um die beiden OCT-Systeme mOCT und FF-TD-OCT zu vergleichen wurde *ex vivo* Lebergewebe einer Maus in beiden Systemen nacheinander gemessen. Das Gewebe wurde zuerst im mOCT-Aufbau gemessen und anschließend im FF-TD-OCT Aufbau. Leber eignet sich zur Untersuchung mit dOCT bzw. dmOCT, da sie ein vergleichsweise stoffwechselaktives Organ darstellt. Für die Messung am mOCT wurde das 127 kHz-Spektrometer mit einer Basler Sprint-Zeilenkamera verwendet und die A-Scan-Rate wurde auf 100 kHz reduziert. Um in beiden Systemen denselben Bildausschnitt messen zu können, wurde zuerst die Markierung im Deckglas mittels OCT-Signal gesucht und anschließend der Bereich innerhalb der Markierung aufgenommen. Am mOCT-Aufbau wurden mit dem Speckle-Varianz Aufnahmemodus der ThorImage Software sequenziell dmOCT B-Scans aufgezeichnet. Jeder dmOCT B-Scan besteht aus 100 B-Scans bei einer B-Scan Abtastrate von 54 Hz. Um ein möglichst großes Volumen zu erzeugen, wurden mehrere Speckle-Varianz Volumen nebeneinander aufgezeichnet. Die Aufnahmezeit betrug ca. 15 Minuten, da aufgrund des begrenzten Arbeitsspeichers einzelne Volumenabschnitte (500 x 50 x 1024 Voxel) auf der Festplatte zwischengespeichert werden mussten. Das gesamte aus einzelnen dmOCT B-Scans zusammengesetzte dmOCT Volumen besteht aus 500 x 550 x 1024 Voxeln (xyz) bei einer Größe von 270 x 285 x 550 μm^3 (xyz). Das dmOCT Volumen wurde für die Visualisierung auf eine Größe von 270 x 285 x 135 μm^3 zugeschnitten, sodass das bei der Fixierung der Probe genutzte Deckglas in der Visualisierung nicht mehr sichtbar ist.

Die am FF-TD-OCT aufgezeichneten dOCT-Aufnahme wurden aus jeweils 1000 en face OCT-Aufnahmen bei einer Abtastung von 300 Hz berechnet. Das FOV der FF-TD-OCT Aufnahme betrug 1440 x 1440 Pixel (xy) bei 1,24 x 1,24 mm^2 (xy) und die Aufnahmezeit für eine en face dOCT-Aufnahme 3,33 Sekunden. Es wurden 50 en face dmOCT-Bilder mit einem Abstand von 5 μm entlang der Tiefe aufgezeichnet. Die Aufnahmezeit für die am FF-TD-OCT durchgeführten Messungen betrug ca. 5 - 10 Minuten, da die Daten nach jeder en face dOCT-Aufnahme zwischengespeichert wurden.

Die beiden aufgezeichneten Volumen wurden anschließend mit der Software Fiji [173] bearbeitet, um sie miteinander vergleichen zu können. Anhand der Glasmarkierung im Probenhalter wurde in den en face Aufnahmen des mOCT und dem FF-TD-OCT Aufbau ein

Unterschied in der Rotation mit einem Winkel von 155 Grad bestimmt. Die FF-TD-OCT Aufnahmen wurden anschließend um den vorher bestimmten Winkel rotiert. Abschließend wurden anhand von ähnlichen Strukturen in den beiden Volumen-Datensätzen von mOCT und FF-TD-OCT exemplarische en face Aufnahmen verglichen. Abbildung 20 stellt jeweils eine en face OCT (a & c) und dOCT/dmOCT Aufnahme (b & d) der beiden Systeme (FF-TD-OCT und mOCT) gegenüber. Die en face dmOCT Ebene ist der dmOCT Volumenaufnahme (e) (roter Pfeil), welche aus sequenziell aufgenommenen dmOCT B-Scans besteht, entnommen. Trotz der ausreichenden Auflösung können in den gemittelten en face mOCT- und FF-TD-OCT OCT-Aufnahmen (a & c) keine zellulären, bzw. subzelluläre Strukturen identifiziert werden. Zusätzlich erschwert der schwache Kontrast und die auftretenden Speckle eine Darstellung von Zellen. Es lassen sich keine zelluläre Details des Gewebes in den gemittelten en face OCT-Bildern erkennen. Hellere Details könnten auf extrazelluläre Matrixstrukturen und dunklere Strukturen auf leere Gefäße hinweisen. Dem gegenüber stehen die dOCT und dmOCT Aufnahmen (b & d). Langsame Bewegungen (0 - 0,5 Hz), mittlere Bewegungen (0,5 - 5 Hz) und schnelle Bewegungen (5 - 25 Hz) sind als blauer, grüner und roter Farbton in einem RGB-Bild dargestellt. Mischfarben ergeben sich aus der Überlagerung des blauen, grünen und roten Farbkanals. Bilder mit dynamischen OCT-Kontrast zeigen zelluläre Strukturen (Abbildung 20, b und d). In den dOCT und dmOCT Aufnahmen ist ausschließlich ein homogener Zelltyp mit einer Größe von 20 - 50 μm ersichtlich. Diese entsprechen am ehesten Hepatozyten, die 80 % des Lebervolumens ausmachen und stoffwechselaktiv sind. Das Zytoplasma erscheint in einem grün/gelblichen Farbton. In der vergrößerten Abbildung (f) zeigt sich, dass im FF-TD-OCT en face dOCT Bild Zellkerne meist dunkel erscheinen, während im dmOCT en face Bild rote Zellkerne mit etwas dunklerer Substruktur (weiße Pfeile) zu erkennen sind, welche am ehesten Kernkörperchen (Nukleolus) entsprechen könnten. Die Anzahl vermutlicher Kernkörperchen variiert von 1 - 3 innerhalb der Zellkerne. In den en face dOCT- und dmOCT-Bildern können im Vergleich zu den OCT-Bildern auch die Zellgrenzen einzelnen Zellen aufgelöst werden. Die dynamischen OCT-Kontrast-Aufnahmen von mOCT und FF-TD-OCT stellen Zellstrukturen in annähernd ähnlichen Farben dar.

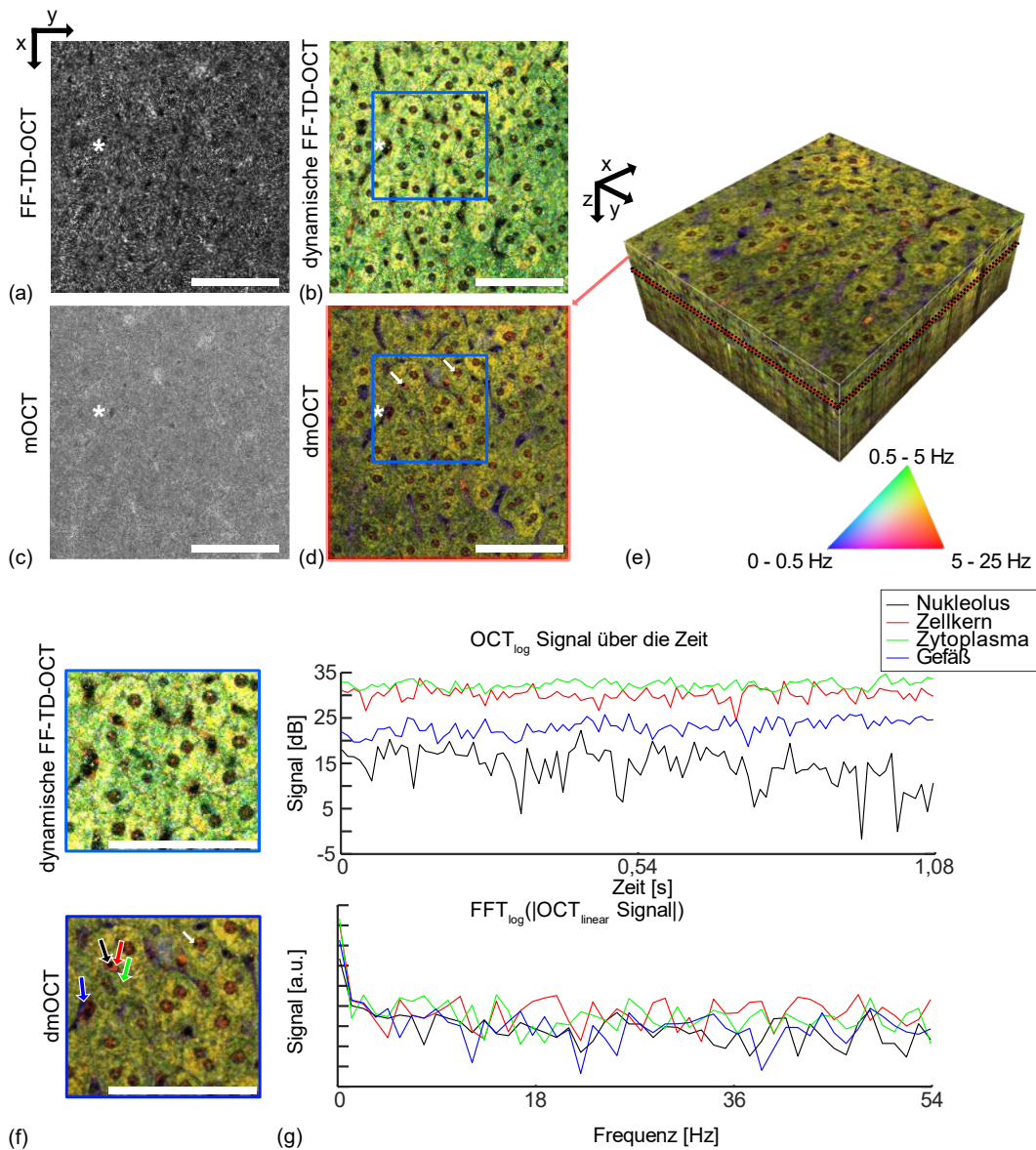
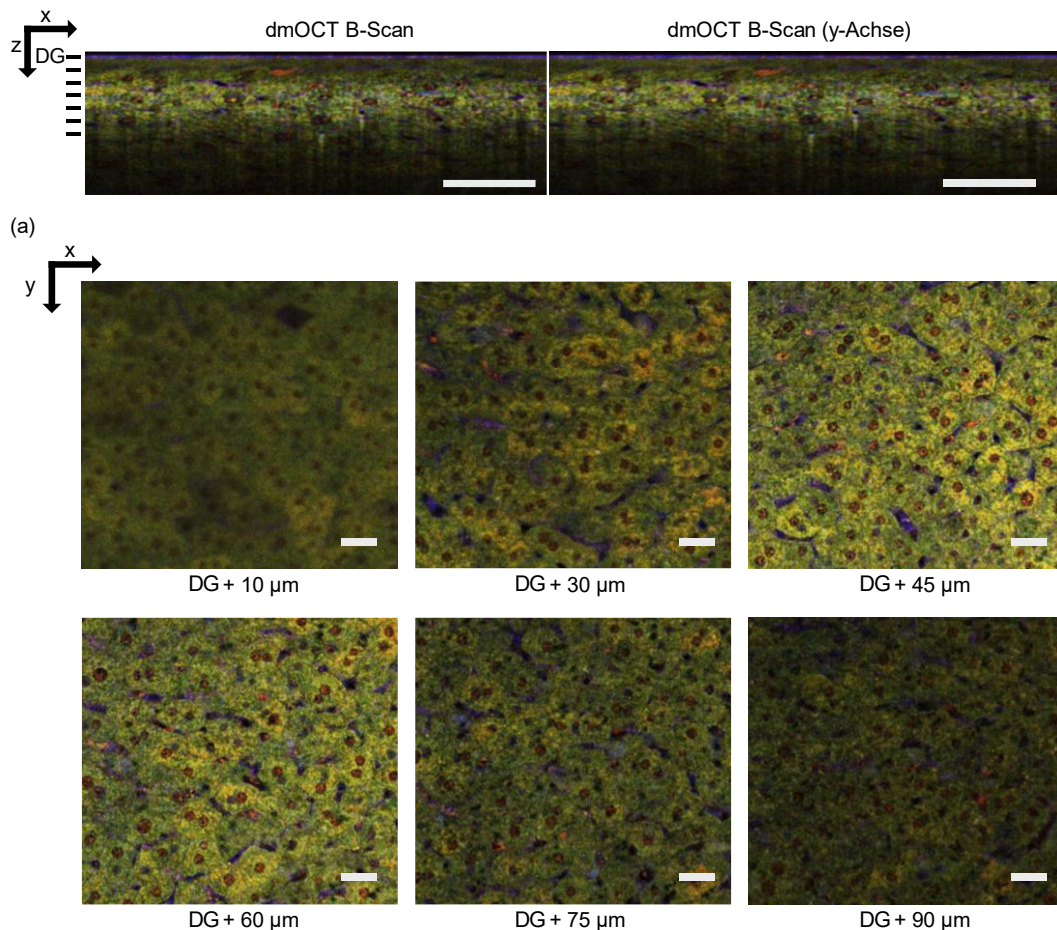


Abbildung 20: OCT und dOCT Aufnahme von ex vivo Mausleber (a) FF-TD-OCT en face OCT Bild und (b) korrespondierende en face dOCT Bild; (c) en face mOCT-Bild aus einer Ebene eines mOCT-Volumens (d) entsprechendes en face Bild mit dynamischen Kontrast. Schwarze Strukturen lassen auf Kerne und Gefäße schließen. Speckle lassen bei den OCT-Bildern keinen Rückschluss auf Zellen zu (d) Der dOCT-Kontrast erlaubt eine kontrastreiche Darstellung von Zellen und subzellulären Strukturen sowie leeren Gefäßen (*); Dunkle Strukturen (weiße Pfeile) innerhalb der rot eingefärbten Zellkerne können als Nucleoli identifiziert werden (e) dmOCT Volumen mit angepasster Helligkeit (f) Vergrößerte Darstellung der en face Ebenen von (b & d). Im vergrößerten Teil der en face dOCT-Aufnahmen können Ähnlichkeiten bei der Verteilung hellerer und dunklerer Grüntöne im Zytoplasma beobachtet werden. Die Nucleoli (schwarz) innerhalb der Zellkerne (rot) sind deutlich erkennbar, wobei auch einzelne und mehrere Nucleoli innerhalb eines Zellkerns in der dmOCT en face Aufnahme ersichtlich sind. (g) Oben: Zeitentwicklung des über 3x3 Pixel gemittelten OCT-Signals von ausgewählten ROIs im Nucleolus (schwarzer Pfeil), Zellkern (roter Pfeil), Zytoplasma (grüner Pfeil) und einem Gefäß (blauer Pfeil). Unten: Fouriertransformiertes OCT-Signal derselben ROIs; Maßstabsbalken: 100 μm

Die Intensität der Farbkomponenten unterscheidet sich leicht, da die Messungen in einem Abstand von 2 Stunden aufgenommen wurden und die Datenakquisition, Algorithmik zur dynamischen OCT-Kontrast Auswertung sowie Nachbearbeitung hinsichtlich Helligkeit der Farbtöne nicht identisch sind. Des Weiteren können Strukturen im Zytoplasma der Zellen identifiziert werden, die im FF-TD-OCT Bild hellgrün gefärbt sind und im dmOCT-Bild in einem ähnlichen helleren Grünton zu erkennen ist. Im Vergleich zu den OCT-Aufnahmen werden auch wesentlich mehr Hohlräume in den dynamischen OCT-Kontrast Aufnahmen zwischen den Zellen ersichtlich. Diese Hohlräume erscheinen in den dOCT und dmOCT Aufnahmen dunkel und könnten leeren Blut- oder Lymphgefäßen entsprechen. In Abbildung 20 (g) sind die Zeitverläufe der logarithmierten OCT-Signale von 4 ausgewählten ROIs sowie die Fouriertransformierten des linearen OCT-Signals dargestellt. Es wurden ROIs im Bereich des Nukleolus (schwarzer Pfeil), Zellkern (roter Pfeil), Zytoplasma (grüner Pfeil) und einem Gefäß (blauer Pfeil) über 3×3 Pixel (xy) gemittelt. Das Zytoplasma hat das höchste OCT-Signal bei 33 dB, gefolgt von Zellkern bei 30 dB, Gefäß bei 23 dB und Nukleolus bei 11 dB. In der Fouriertransformierten zeigt sich, dass der Zellkern höhere Frequenzanteile in den Frequenzbereich ab 5 Hz aufweist. Nukleolus und das Gefäß zeigen ähnlich schwache Frequenzanteile, wohingegen das Zytoplasma im Bereich von 0,5 - 5 Hz ein stärkeres Signal aufweist. Es zeigt sich, dass die Spektren verrauscht sind und die Unterschiede daher kaum ersichtlich. Erst durch die Mittelung über die Frequenzbänder werden die Unterschiede erkennbar.

In Abbildung 21 (a) sind zwei B-Scans über die xz- bzw. yz-Achse und ausgewählte en face Ebenen (b) unterhalb des Deckglases des dmOCT Volumens exemplarisch dargestellt. Die Tiefe der en face Bilder im Volumen ist im B-Scan durch die Strichmarkierung an der Seite eingezeichnet. In den B-Scans ist der Fokus in einer Tiefe von ca. $50 \mu\text{m}$ unter dem Deckglas (DG) anhand des Helligkeitsgradienten deutlich sichtbar. Im Fokusbereich können die subzellulären Strukturen wie Zellkerne und Zellkernchen deutlich voneinander differenziert werden. En face Ebenen außerhalb des Fokus erscheinen dunkler und dieselben zellulären Substrukturen werden schlechter dargestellt. In $10 \mu\text{m}$ Tiefe unterhalb des Deckglases zeigt sich der Einfluss des Defokus anhand der nicht mehr scharf abgrenzbaren Zellgrenzen. In $90 \mu\text{m}$ Tiefe unterhalb des Deckglases werden die zellulären Strukturen stark durch Rauschen beeinträchtigt, da weniger Licht zurückgestreut wird.



(b)

Abbildung 21: Exemplarische en face dmOCT Bilder aus verschiedenen Tiefen. (a) B-Scans über die schnell scannende Achse (links) und langsam scannende Achse (rechts). (b) En face dmOCT Bilder aus unterschiedlichen Tiefen unterhalb des Deckglases (DG). 10 μm unterhalb des Deckglases ist ein Defokus erkennbar und die Zellgrenzen sind nicht mehr scharf abgrenzbar. In einer Tiefe von 45 bis 60 μm ist der Fokus ersichtlich. Zellen und subzelluläre Strukturen (Zellkerne und Zellkernchen) sind deutlich erkennbar und heller. 75 μm unterhalb des Deckglases erscheinen die Zellen wieder defokussiert und die Helligkeit nimmt ab. Maßstabsbalken: 100 μm

Abbildung 22 stellt en face mOCT und dmOCT Bilder (a & b) mitsamt einer Fourier-Analyse (c-f) gegenüber, um zu untersuchen, inwieweit sich die Unterschiede in der Auflösung in einem unterschiedlichen Raumfrequenzspektrum darstellen. Die en face dmOCT Aufnahme (Abbildung 22 b) ist über die dmOCT FFT-Auswertung berechnet worden und wurde für die Frequenzraum-Auswertung in ein Grauwertbild umgewandelt. Die Helligkeit in den en face dmOCT Aufnahmen in Abbildung 20 und Abbildung 22 unterscheidet sich, da die Normierung in Abbildung 22 nicht auf dem gesamten dmOCT Volumen durchgeführt wurde. In (d) und (e) sind die normierten Betragsanteile der Fouriertransformierten der en face mOCT- und dm-OCT Bilder (a & b) dargestellt. In (c) ist

die Fouriertransformierte von dem gemittelten komplexen en face OCT-Bild (a) dargestellt. Aufgrund der konfokalen Detektion ist in x-Richtung ein gaußförmiger Verlauf erkennbar. Die scharfe Abgrenzung der Apertur entlang der langsam scannenden y-Achse ist nicht vorhanden. Dies ist auf Bewegungsartefakte während des Scannens zurückzuführen, welche zu hochfrequenten Phasenänderungen in dieser Richtung führen. Abbildung 22 (f) stellt einen Plot einer ROI entlang der x-Achse um das Zentrum von (d) und (e) dar. Es wurde über 20 Pixel in y gemittelt (blaue und rote ROI). Es ist ersichtlich, dass die Auswertung über die FFT deutlich mehr Details über nahezu alle Frequenzen rekonstruiert, was sich äquivalent auch im Vergleich zwischen en face OCT und dmOCT Bild hinsichtlich der Details darstellt.

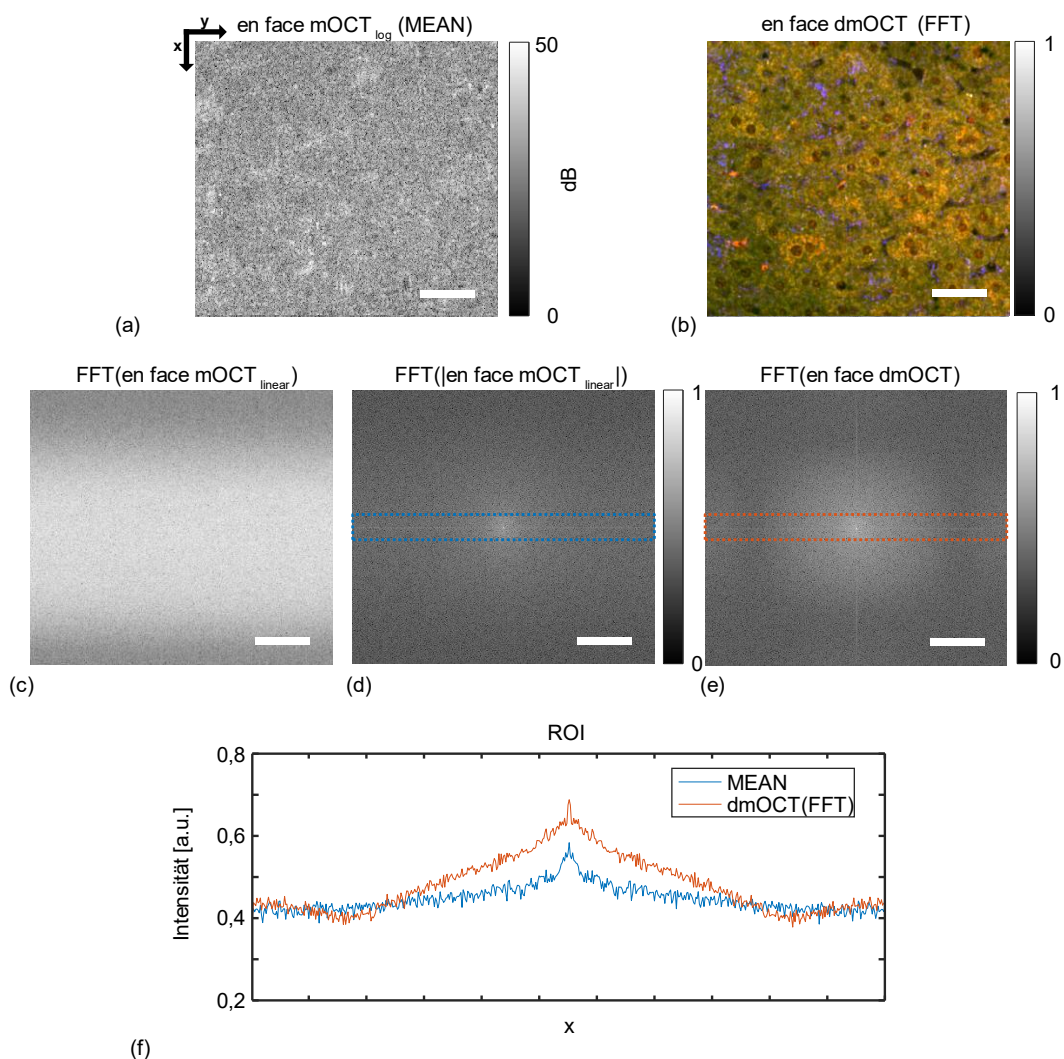


Abbildung 22: Frequenzanalyse eines en face Bildes mit mOCT und dmOCT (FFT) von ex vivo Leber (a) gemittelter en face mOCT; (b) en face dmOCT Aufnahme (c) Fouriertransformierte des komplexen OCT-Signals von (a); (d) Fouriertransformierte des Betragsteil von (a); (e) Fouriertransformierte von (b); (f) Plot einer ROI (in x gemittelt) um das Zentrum von (d) und (e). Maßstabsbalken: 50 μm

4.1.2 dmOCT B-Scan

Als zweites Modell für die dmOCT wurde Mauszunge gewählt, um ein Plattenepithelgewebe mit mehreren Schichten darzustellen.

Die Zunge wurde der Maus entnommen, im Probenhalter fixiert und anschließend an unterschiedlichen Stellen vermessen. Von der Probe wurde nach der Messung eine Histologie mit einem HE-Schnellfärbeverfahren erstellt. Abbildung 23 stellt eine repräsentative Histologie (a) und den gemittelten mOCT B-Scans eines Datensatzes, sowie die dmOCT Auswertung (c & d) über die FFT der *ex vivo* gemessenen Mauszunge gegenüber.

Der Datensatz besteht aus 150 B-Scans mit 500×1024 px (xz) die in 1,38 Sekunden aufgenommen wurden. Unter Annahme eines Brechungsindex für Mauszunge von $n = 1,3$ ergibt sich ein Messfenster von $500 \times 660 \mu\text{m}^2$ (xz). Der B-Scan wurde für eine bessere Visualisierung in z-Richtung beschnitten. Die A-Scan-Rate betrug 100 kHz und die B-Scan-Rate 108 Hz. Nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem wurden somit Frequenzen von 0 bis 54 Hz erfasst. Die Helligkeit der dmOCT B-Scans in Abbildung 23 wurde zur besseren Visualisierung angepasst.

In Abbildung 23 (b) ist der über alle 150 B-Scans inkohärent gemittelte B-Scan des Datensatzes dargestellt. In der oberen Bildhälfte befindet sich in etwa $50 \mu\text{m}$ Tiefe die Unterkante des Deckglases (VI) des Probenhalters im direkten Kontakt zu der sich darunter befindlichen Probe. Der Fokus befindet sich ca. $100 \mu\text{m}$ unter dem Deckglas. Ersichtlich sind vor allem Speckle und einige hellere Bereiche. Die leicht hellere Schicht in einer Tiefe von $300 \mu\text{m}$ ist als Lamina propria (IV) interpretierbar. Die Darstellung des gemittelten B-Scans (b) zeigt auch im Vergleich zum histologischen Schnitt (a) wenige ähnliche Strukturen. Die Probe ist bis zu einer Tiefe von $300 \mu\text{m}$ als hellere Struktur ersichtlich (b). Mit der in Kapitel 3.2 beschriebenen dmOCT FFT-Auswertung werden histologisch relevante Schichten im gesamten FOV deutlich sichtbar (c & d). Dabei können fünf verschiedene Schichten unterschieden werden.

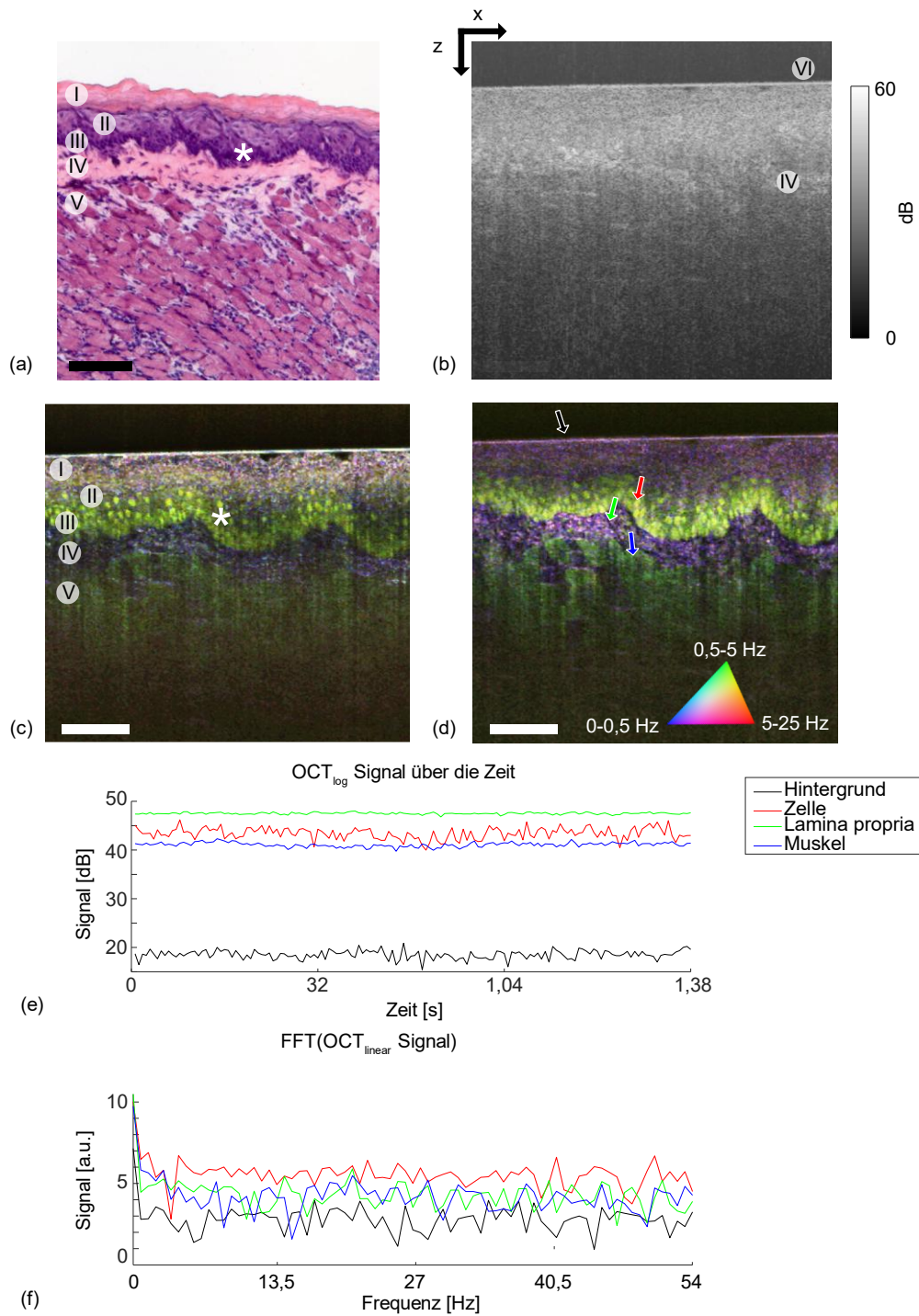


Abbildung 23: dmOCT B-Scan von ex vivo Mauszunge (a) HE gefärbte Histologie der abgebildeten Probe an einer repräsentativen Stelle: (I) Stratum Corneum, (II) Stratum granulosum und stratum spinosum, (III) Stratum basale, (IV) Lamina propria, (V) Muskel und (VI) Glasplatte. (b) gemittelter OCT B-Scan von der Zunge der Maus (c) Entsprechendes dmOCT-Bild mit einem Fokus in der Basalzellschicht mit Zellkernen und angepasster Helligkeit (*). (d) dmOCT-Bild mit einem Fokus in der Lamina propria (e) OCT-Signal ausgewählter ROIs im Bereich des Hintergrunds (schwarz), einer Basalzelle (rot), der Lamina propria (grün) und der Muskelschicht (blau) über 150 B-Scans. (f) Fouriertransformierte der 4 ROIs des linearen OCT Signals bei einer maximalen Abtastung von 54 Hz. Maßstabsbalken: 100 μm .

Unter der Glasplatte (VI) kann das geschichtete verhornte Plattenepithel (stratum corneum) (I) mit einem Übergang zur Granularzellschicht (stratum granulosum) und Stachelzellschicht (stratum spinosum) (II) in einem lila bzw. lila-grünlichen Farbton dargestellt werden. Daran anschließend befindet sich die Basalzellschicht (stratum basale) (III), die durch gelb gefärbte Zellkerne (*) gekennzeichnet ist. Da sich der optische Fokus in diesen Bereich befand, wird die Basalschicht mit höchster Auflösung abgebildet. Darunter befindend können zwei weitere subepitheliale Schichten, Bindegewebe in lila (Lamina propria) (IV) und grün gefärbte skeletale Muskelzellen bzw. Skelettmuskelfasern (V) unterschieden werden. Durch Verschiebung des Fokus unter die Basalschicht (d) erhöht sich die Sichtbarkeit der Muskelschicht. Die Glasplatte ist in einem weißen Farbton ersichtlich (VI). Dieselben Gewebestrukturen können im gemittelten OCT B-Scan nicht erkannt werden. Die dmOCT B-Scans stellen ähnliche Strukturen wie in HE-gefärbten histologischen Schnitten (a) dar. Selbst weit über die Fokusebene hinaus sind zelluläre Strukturen erkennbar, die in gemittelten OCT-Bildern typischerweise selbst bei Fokussierung auf die Epithelschicht nicht zu erkennen sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Implementierung der dOCT in einem scannenden mOCT zu einer Kontraststeigerung führen, die die Identifizierung einzelner Epithelzellen ermöglicht.

In Abbildung 23 (e) sind Signale von einer Zelle (roter Pfeil), der Lamina propria (grüner Pfeil), des Muskelgewebes (blauer Pfeil) und vom Hintergrund (schwarzer Pfeil) über dem Deckglas einer 5 x 5 Pixel-ROI dargestellt. Die Lamina propria hat das stärkste OCT-Signal bei 47 dB, gefolgt vom Zellsignal bei 44 dB und Muskelgewebe bei 32 dB. Der Hintergrund hat ein 17 dB starkes Signal. In (f) sind die entsprechenden logarithmierten Beträge der Fouriertransformierten des jeweiligen linearen OCT-Signals dargestellt. Bei allen 4 ROIs sind keine erkennbaren dominanten Frequenzen vorhanden. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Intensität. Die Farben ergeben sich durch die Integration der einzelnen Frequenzbanden und der darauffolgenden Normierung.

Abhängigkeit der Bildqualität von der axialen Auflösung

Zur Bestimmung der minimal möglichen axialen Auflösung, die eine Detektion von zellulären Strukturen erlaubt, wurde die axiale Auflösung numerisch durch die Anpassung der Breite des Hann-Fensters bei der Rekonstruktion der Rohdaten zur dmOCT reduziert. Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der unterschiedlich simulierten axialen Auflösung dar. Es wurden fünf verschiedene axiale Auflösungen bei $\Delta z = 1,9 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$, $7 \mu\text{m}$, $17 \mu\text{m}$ und $25 \mu\text{m}$ simuliert. In (a) ist das gemittelte OCT-Bild von Mauszunge dargestellt. In (b) ist die FFT und in (c) die PCA basierte Auswertung dargestellt.

In den über die Zeit gemittelten B-Scans zeigt sich, dass Speckle in z-Richtung verschmiert werden. Das Deckglas ist bei $\Delta z = 25 \mu\text{m}$ nicht von sich darunter befindlichen Gewebe unterscheidbar. Bei einer axialen Auflösung von $\Delta z = 17 \mu\text{m}$ und $7 \mu\text{m}$ sind keine zellulären Details durch Intensitätsunterschiede erkennbar. Erst ab einer axialen Auflösung von $\Delta z = 3 \mu\text{m}$ und $1,9 \mu\text{m}$ lassen erste Intensitätsunterschiede im Gewebe auf mögliche Gewebsunterschiede schließen.

In der PCA-Darstellung kann schon bei einer simulierten axialen Auflösung von $25 \mu\text{m}$ die Basalzellschicht gegenüber den umliegenden Strukturen differenziert werden. Auch in der FFT basierten Auswertung zeigt sich, dass die dynamischen Bewegungen der Zellen ebenfalls erfasst werden können und die Basalzellschicht durch die farbliche Unterscheidung zum Hintergrund von grün zu lila ersichtlich ist. Der direkte Vergleich zwischen PCA- und FFT-Auswertung zeigt, dass die Muskelschicht und die Lamina propria in der FFT-Auswertung durch den Wechsel der Farbtöne in die Tiefe von Lila zu Grün besser voneinander differenzierbar werden können. Im Übergang bei einer axialen Auflösung von $17 \mu\text{m}$ zu $7 \mu\text{m}$ können in der PCA- und FFT-Auswertung darüber hinaus einzelne Basalzellen detektiert werden. In der PCA-Auswertung lassen sich die einzelnen Zellen im Vergleich zur FFT-Auswertung deutlicher voneinander abgrenzen. Eine axiale Auflösung von $3 \mu\text{m}$ ermöglicht in der PCA- und FFT-Auswertung bereits eine scharfe Abgrenzung der Basalzellen zueinander. Bei der maximalen axialen Auflösung von $1,9 \mu\text{m}$ können in der PCA- und FFT-Auswertung auch außerhalb des Fokusbereich befindliche Zellen identifiziert werden.

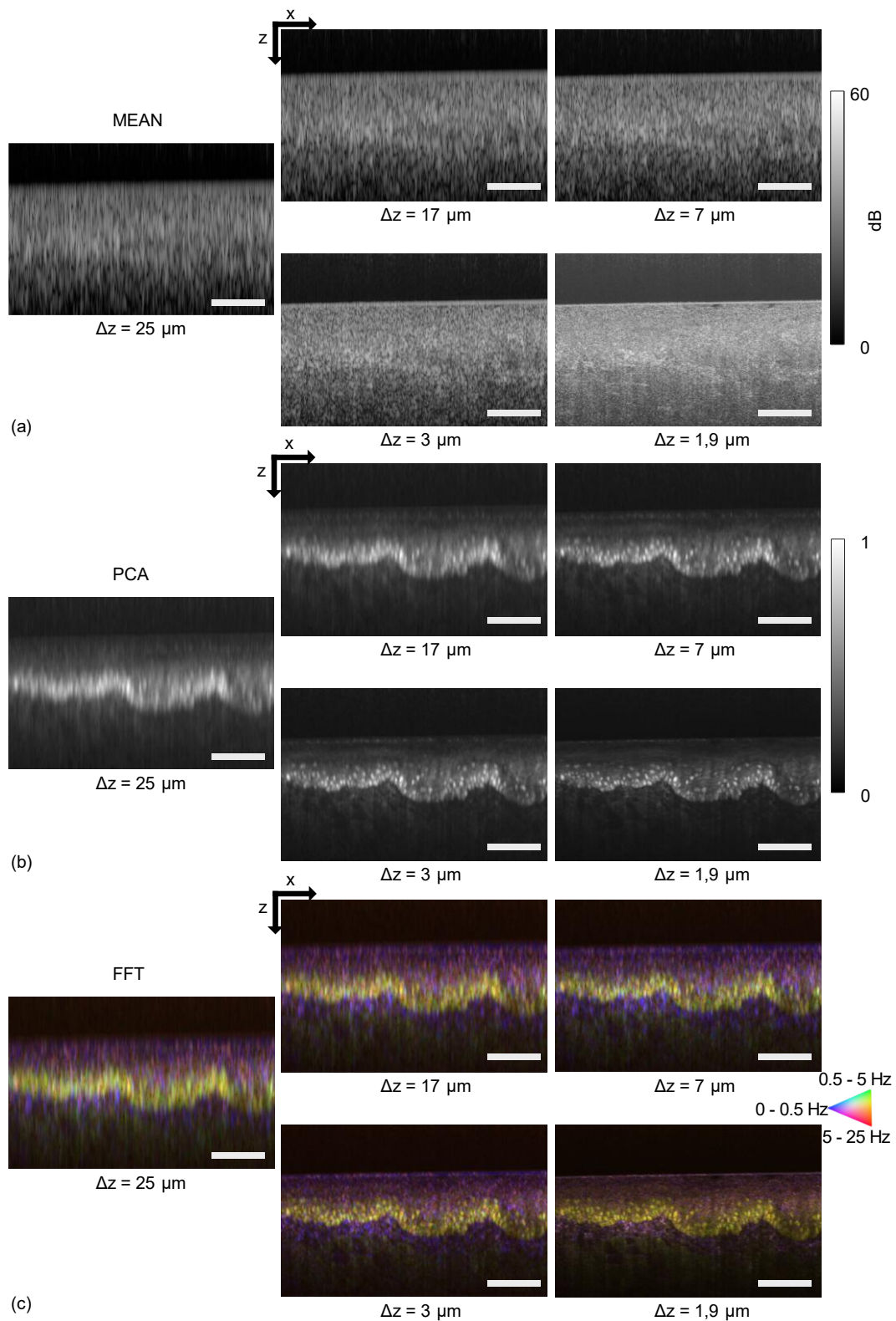


Abbildung 24: dmOCT in Abhängigkeit zu unterschiedlich simulierter axialer Auflösung (a) gemitteltes B-Scans (b) PCA basierte dmOCT (c) FFT basierte dmOCT. Bereits bei einer Auflösung von $25 \mu\text{m}$ kann die Basalzellschicht in der dmOCT deutlich von umgebendem Gewebe differenziert werden. $17 \mu\text{m}$ simulierte axiale Auflösung ermöglichen eine erste Differenzierung von Basalzellen in der PCA. Ab einer simulierten axialen Auflösung von $7 \mu\text{m}$ können in der PCA und FFT individuelle Zellen unterschieden und bei einer simulierten axialen Auflösung von $3 \mu\text{m}$ können diese auch deutlich voneinander differenziert werden. Bei der maximal erreichbaren axialen Auflösung von $1,9 \mu\text{m}$ können auch zelluläre Strukturen außerhalb des Fokus differenziert werden. Maßstabsbalken: $100 \mu\text{m}$

Kontrast-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit der Anzahl von B-Scans

Um die Abhängigkeit der Aufnahmezeit auf die Qualität der dmOCT Bilder zu evaluieren, wurde das Kontrast-Rausch-Verhältnis (CNR) am Beispiel des *ex vivo* Mausungen-OCT-Datensatz ausgewertet. In Abbildung 25 sind der erste B-Scan des Datensatzes (a) und die PCA-Auswertung über den gesamten Datensatz (b) mit der normierten Kontrast-Rausch-Verhältnis Auswertung (c) und exemplarischen Ausschnitten der dmOCT B-Scans (d) zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit STD-, PCA- und FFT-Auswertung dargestellt. Um das CNR bei den FFT-Auswertungen bestimmen zu können, wurden die RGB-Bilder in Grauwertbilder umgewandelt. Die FFT-Auswertung erzeugt erst nach 12 B-Scans ein dmOCT Bild, da das Frequenzband nicht ausreicht, um die Einteilung in langsame, mittlere und schnelle Frequenzen vorzunehmen. Bei weniger als 12 B-Scans können nach der Fourier-Transformation nur noch 6 Bins oder weniger für die Einteilung der Frequenzen von 0 bis 54 Hz genutzt werden, sodass die Unterscheidung der Frequenzkomponenten für langsame und mittlere Frequenzen bei dieser Probe nicht mehr ausreichend ist. Zur Auswertung des Kontrast-Rausch-Verhältnisses wurde das in xz gemittelte Signal eines Rechtecks im oberen Messbereich als Rauschregion (rotes Rechteck) im Verhältnis zu einer ROI im Bereich des Fokus mit Basalzellen als Signalregion (schwarzes Rechteck) bestimmt. In (c) sind nach Formel 3.5 die CNR-Werte für die PCA (blau), STD (rot) und FFT (gelb) Auswertung des Signals gegenüber der Anzahl der B-Scans aufgetragen. Bereits nach 10 ausgewerteten dmOCT B-Scans kann die Basalschicht bei STD und PCA rekonstruiert werden. In der PCA-Auswertung sind bereits einzelne Zellen erkennbar und die PCA erreicht 80 % ihres maximalen CNR Wertes, die STD erreicht nur 66 %. Nach 25 B-Scans können in allen drei Auswertungen einzelne Basalzellen identifiziert werden, wobei die Auswertung über die STD von einem stärkeren Rauschen überlagert wird, welches den Kontrast zwischen Zellen und Hintergrund reduziert. Nach 75 B-Scans bzw. 0,69 s können auch außerhalb der Basalschicht einzelne Zellen in der PCA-Auswertung identifiziert werden (*). Der CNR-Wert der FFT-Auswertung schwankt leicht über die Anzahl der ausgewerteten B-Scans, da die Einteilung der Frequenzen im Frequenzraum durch die variierende Anzahl an B-Scans schwankt. Die CNR-Werte von PCA, STD und FFT gehen ab ca. 50 B-Scans in eine Sättigung über.

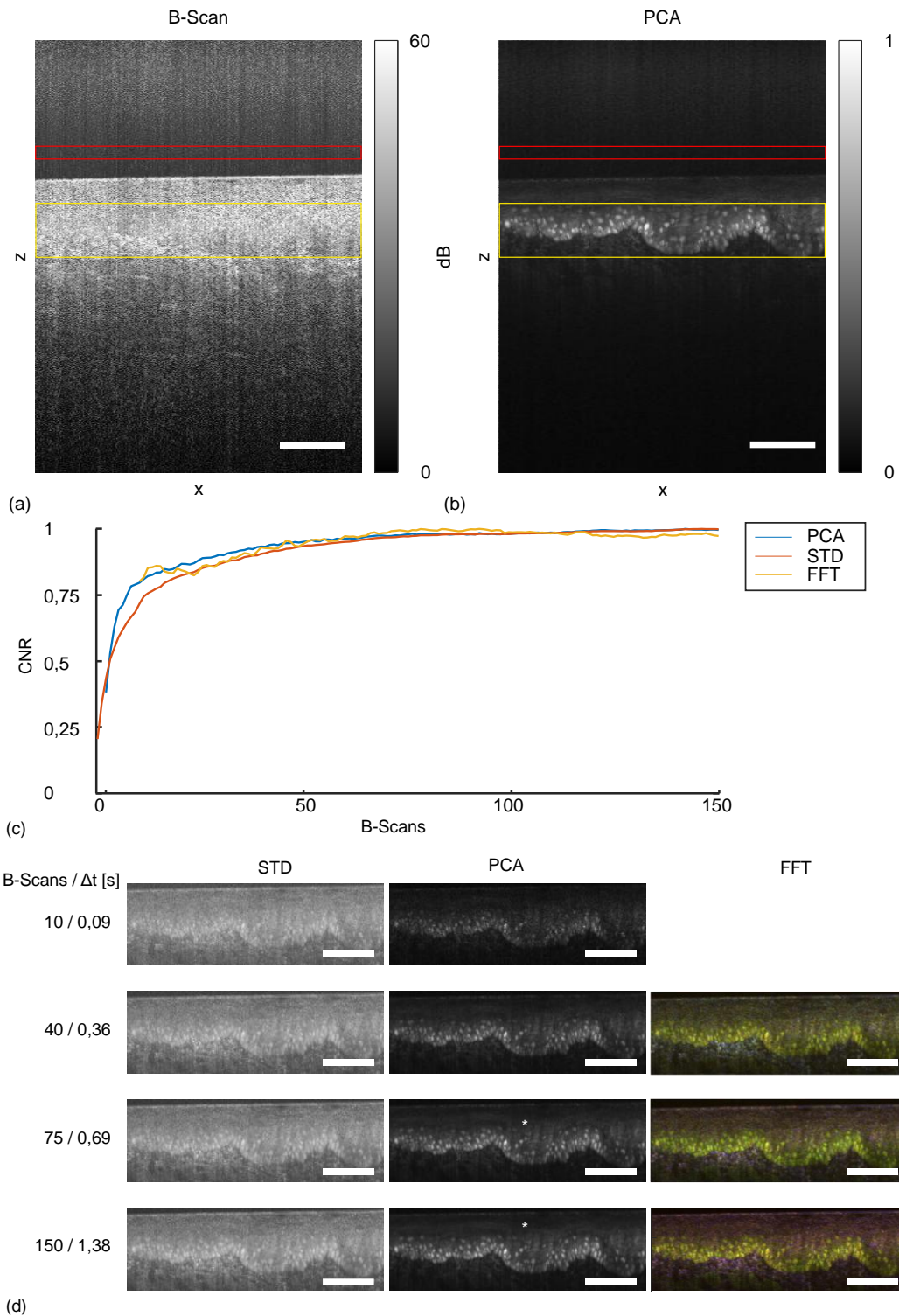


Abbildung 25: Kontrast-Rausch-Verhältnis (CNR) in Abhängigkeit der Zahl der ausgewerteten B-Scans - B-Scan (a) und PCA-dmOCT B-Scan (b) über den gesamten ex vivo Mausungen OCT-Datensatz. (c) Auswertung der PCA, STD und FFT in Abhängigkeit zur Anzahl von B-Scans bzw. Aufnahmezeit. Die FFT kann erst ab 12 B-Scans ausgewertet werden. Mittels PCA kann innerhalb der ersten 50 B-Scans ein höheres Kontrast-Rausch-Verhältnis erreicht werden. PCA, STD und FFT gehen ab 50 B-Scans in eine Sättigung über. (d) Exemplarische dmOCT B-Scans (STD, PCA & FFT) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Maßstabsbalken: 100 μm

Phasenbasierte dmOCT

Da das mOCT-Signal zusätzlich zum Betrag auch die Phase enthält, wurde evaluiert, inwieweit dmOCT auch über eine Auswertung der Fluktuation der Phase möglich ist. Die Auswertung der gemessenen *ex vivo* Mauszunge (500 x 1024 Pixel, 500 x 660 μm^2 , Aufnahmezeit: 1,38 s, B-Scan Abtastfrequenz: 108 Hz) über den Phasenanteil ist in Abbildung 26 dargestellt. Das unkorrigierte Phasendifferenzbild ist in (a) dargestellt. Das Deckglas ist in einer Tiefe von ca. 250 μm (*) ersichtlich. Es lassen sich keine zellulären bzw. subzellulären Strukturen in den Phasendifferenzbildern erkennen. Um Bewegungen entlang der Tiefe während der Aufnahme des Datensatzes zu reduzieren, wurde der Datensatz mit einem selbst entwickelten Algorithmus korrigiert. Dafür wurde das Deckglas als Referenzschicht ausgewählt, da es in den B-Scans einfach zu segmentieren

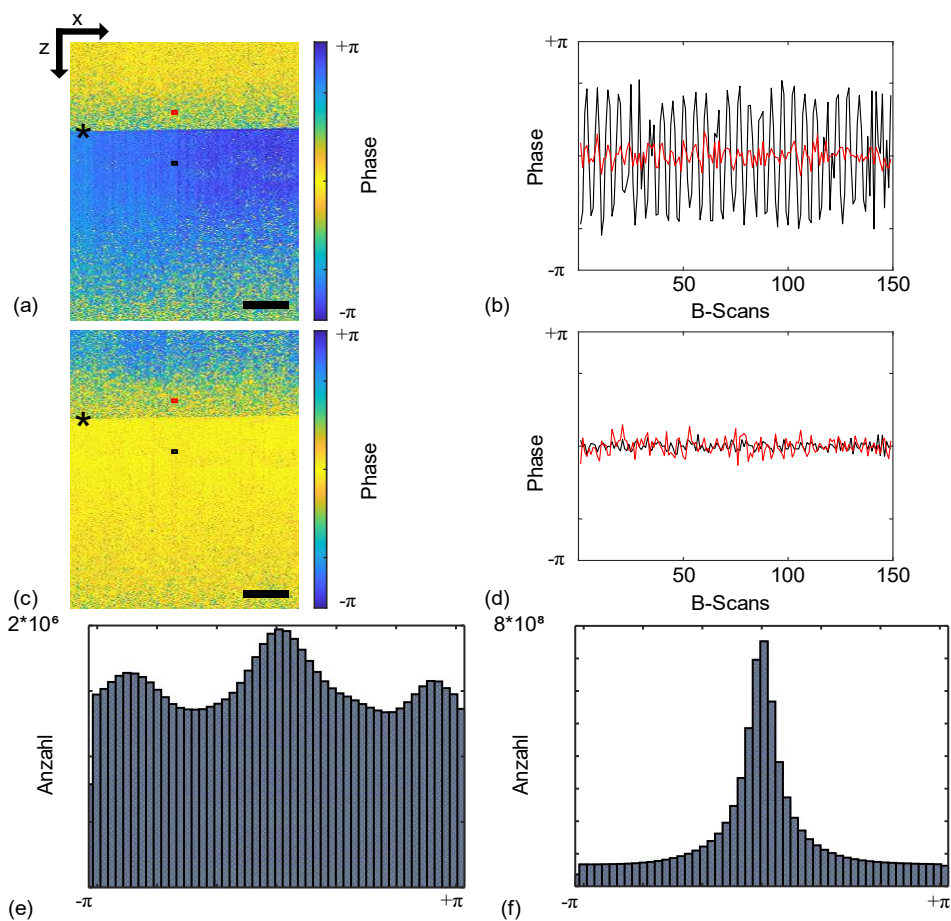


Abbildung 26: Auswertung der Phase der Messung der *ex vivo* Mauszunge. In (a & c) sind jeweils 2 ROIs an gleicher Position eingezeichnet und das Deckglas (*) markiert. Die schwarze ROI befindet sich im Gewebe und die rote ROI im Immersionsmedium (a) Standardabweichung eines Phasendifferenzbildes über die Zeit. (b) Gemittelte Phasen in den beiden ROIs über alle B-Scans. (c) Standardabweichung des ersten Phasendifferenzbildes nach vorheriger Phasenkorrektur. (d) Geplottete Phasen innerhalb der ROIs nach Bewegungskorrektur (e & f) Verteilung der Phasen im B-Scan vor (e) und nach (f) Bewegungskorrektur; Maßstabsbalken: 100 μm

ist und die Phase dort ohne Bewegungsartefakte als konstant angenommen werden kann. Die Phasen wurden in aufeinanderfolgenden B-Scans in z verschoben, sodass die Phasendifferenz aufeinanderfolgender B-Scans in der Referenzschicht abnahm. Dies erfolgte über einen Optimierungsalgorithmus, der das Minimum der Phasendifferenz bestimmte.

Zur Auswertung über den gesamten Datensatz von unkorrigierten und korrigierten Bewegungen wurden zwei ROIs in den Phasendifferenzbildern ausgewertet (Abbildung 27, a und b). Die mit einem schwarzen Rechteck gekennzeichnete ROI befindet sich im Gewebe und die rote ROI außerhalb. Der zeitliche Verlauf der Phasendifferenzen in den beiden ROIs vor und nach der Bewegungskorrektur ist jeweils in (b & d) dargestellt. Die Phase im Gewebe schwankt im unkorrigierten Fall (a & b) periodisch zwischen $-\pi$ und $+\pi$ durch Bewegungen während der Messungen. Außerhalb des Gewebes tritt eine zufälliger Phasor auf. Nach Korrektur von Bewegungen nimmt die Standardabweichung im Hintergrund von 0,24 rad auf 0,21 rad und im Bereich des Gewebes von 1,35 rad auf 0,11 rad ab. In Abbildung 27 (e & f) ist die Verteilung der Phasendifferenzen vor (e) und nach (f) Bewegungskorrektur über den gesamten Datensatz dargestellt. In den Histogrammen ist ersichtlich, dass die Phasendifferenzen nach der Bewegungskorrektur über alle B-Scans deutlich abnehmen und der Einfluss von Bewegungen entlang der optischen Achse auf die Phasen der Aufnahme erfolgreich reduziert wurden.

In Abbildung 27 ist die Phasen-basierte dmOCT auf Basis des Phasenanteils der OCT-Daten über die Berechnung der Standardabweichung im unkorrigierten Fall (a) und korrigierten Fall (b) dargestellt. Zusätzlich sind die FFT- (c) und PCA-Auswertungen (d) des korrigierten Datensatzes dargestellt. Es zeigt sich, dass ähnlich zur Auswertung des Betrags die Basalmembranschicht mit einzelnen Zellen sichtbar wird. Im direkten Vergleich zu betragsbasierter Auswertung ist ein deutlich höheres Rauschen in den Bildern zu erkennen und die unterschiedlichen Schichten lassen sich nicht mehr voneinander unterscheiden. Die Lamina propria kann in der FFT-Auswertung farblich und in der STD- und PCA-Auswertung anhand der Intensitätsunterschiede von der darunterliegenden Muskelschicht differenziert werden.

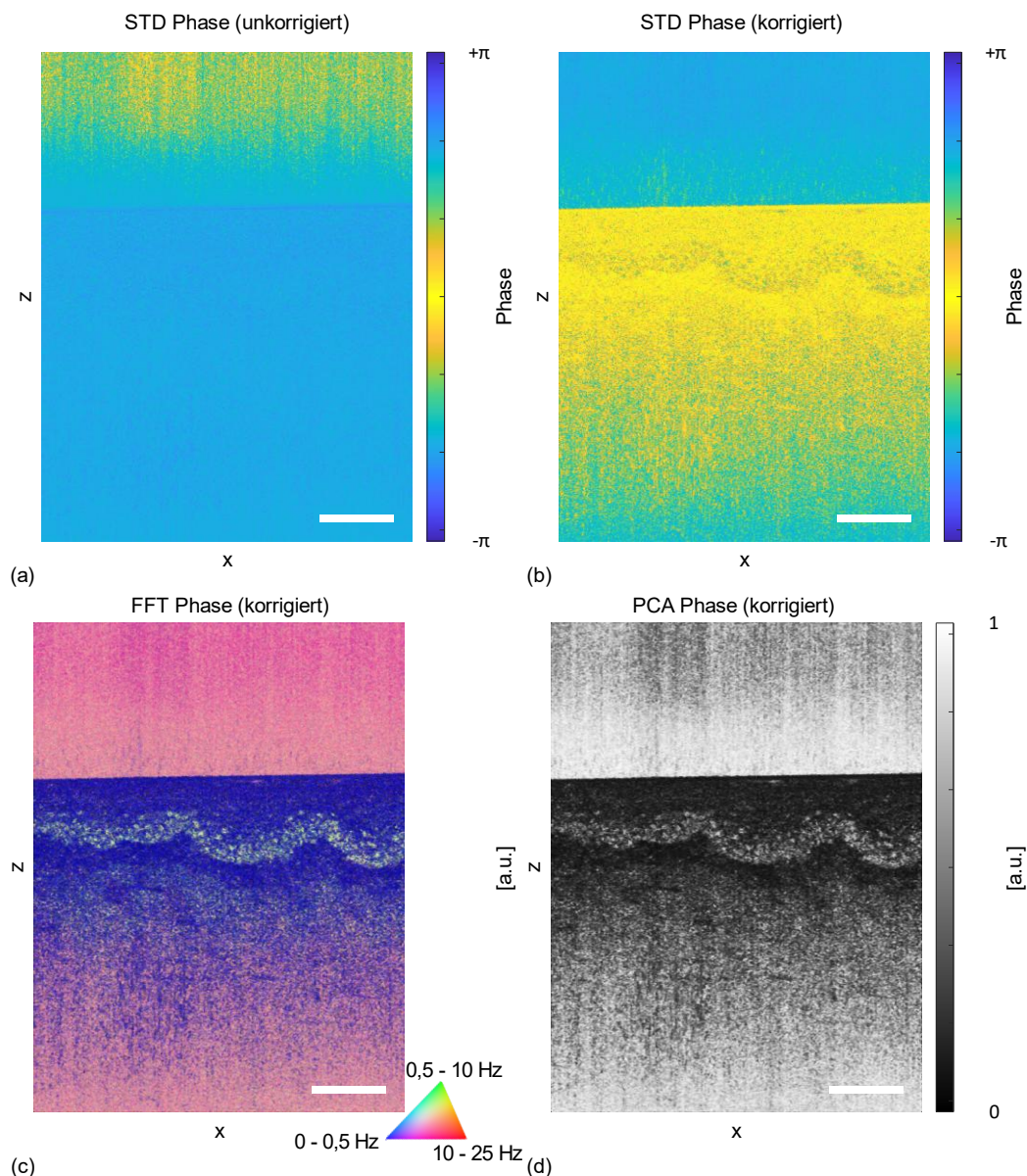


Abbildung 27: Phasenbasierte dmOCT (STD) (a) ohne vorheriger Bewegungskorrektur (b-d) Phasenbasierte dmOCT (STD, FFT und PCA) mit vorheriger Bewegungskorrektur. Durch die Bewegungskorrektur können einzelne Zellen der Basalzellschicht erkannt werden. In der FFT-Auswertung können die Basalzellschicht, Lamina propria und Muskelzellschicht farblich voneinander differenziert werden. Maßstabsbalken: 100 μm

4.1.3 dmOCT Zeitserie

Trachea wurde zur Darstellung des aktiven Schleimtransports durch Zilien ausgewählt. Die kollektive Bewegung der epithelialen Flimmerhärchen treibt den Schleim und die Flüssigkeitsschicht über den Epithelzellen an. Dieser aktive Prozess ist für die Reinigung der Atemwege von entscheidender Bedeutung und eine Störung kann Kennzeichen mehrerer Erkrankungen sein [174, 175]. Eine Fehlfunktion der Zilien, Atmung oder Husten

beeinflussen den physiologischen Transport und führen zu einem ungleichmäßigen Schleimtransport. Eine unregelmäßige Verteilung der Flimmerzellen kann zu komplexen Bewegungen der Mukusschicht führen. Die *ex vivo* Trachea einer Maus wurde über einen Zeitraum von mehreren Minuten mittels dmOCT aufgezeichnet. Die Trachealwand wurde auf Silikongel mit Nadeln in einer Petrischale fixiert und Flüssigkeit hinzugefügt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Das FOV betrug 500×1024 px (xz) bei $500 \times 660 \mu\text{m}^2$ (xz). Alle 10 Sekunden wurde ein dmOCT B-Scan über einen Zeitraum von 30 min aufgenommen. In Abbildung 28 sind ein gemittelter B-Scan (a), ein vergrößerter Ausschnitt desselben (b, oben), der dmOCT B-Scan (b, unten), eine H&E-gefärbte Histologie eines Luftröhrenquerschnitts (d, unten), eine Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme (REM) von Flimmerzellen (d, oben) und ausgewählte dmOCT B-Scans zu unterschiedlichen Zeitpunkten (c) aus dem Datensatz dargestellt. Der Fokus des Objektivs befindet sich ca. $50 \mu\text{m}$ unter der Oberfläche der Trachealwand. Der B-Scan und dmOCT B-Scan wurde in die Tiefe auf 500×400 px (xz) bzw. $500 \times 257 \mu\text{m}^2$ (xz) für eine bessere Visualisierung beschnitten. Hierdurch wurden in den ersten $200 \mu\text{m}$ Autokorrelations-Artefakte, die durch die starke Rückstreuung der Oberfläche der Trachea erzeugt werden, entfernt. Einzelne A-Scans sind durch die Rückstreuung übersteuert und sind als helle vertikale Streifen im B-Scan erkennbar. In einer Tiefe von ca. $200 \mu\text{m}$ bis ca. $350 \mu\text{m}$ befindet sich die Trachea. Im oberen Bereich der Trachea sind Zilien (z) erkennbar, die von einzelnen sich darunter befindlichen Zilien-tragenden Epithelzellen ausgehen. Da die Zilienbewegung im Bereich von 10 - 15 Hz für den aktiven Schleimtransport [169, 176] noch aktiv ist, werden sie durch die Mittelung als verschwommene Strukturen im gemittelten B-Scan dargestellt. Die Epithelschicht (e) befindet sich direkt unter den Zilien und ist ca. $15 - 20 \mu\text{m}$ dick. Zelluläre Strukturen sind von Speckle-Rauschen überlagert und es lassen sich keine einzelnen Zellen oder subzelluläre Strukturen erkennen. An die Epithelschicht angrenzend lässt sich eine hellere dünne Linie erkennen, die dem Bindegewebe (b) zuzuordnen ist und aus Kollagen- und Elastinfasern besteht. Unter dem Bindegewebe befindet sich Muskelgewebe mit einer Dicke von ca. $150 \mu\text{m}$. Es lassen sich einzelne Hohlräume als schwarze Strukturen innerhalb des Muskelgewebe identifizieren. Diese entsprechen entweder Lymph- oder Blutgefäßen (v). Die Auswertung zur dmOCT an demselben Datensatz erzeugt auch am Beispiel der Trachea ein deutlich besseren Kontrast der Strukturen. Über der Trachea sind

einzelne entlang der x-Achse lang gezogene Strukturen (grüner Pfeil) zu erkennen, die durch kleinere sich bewegende Teilchen während der Aufnahme der 150 B-Scans erzeugt

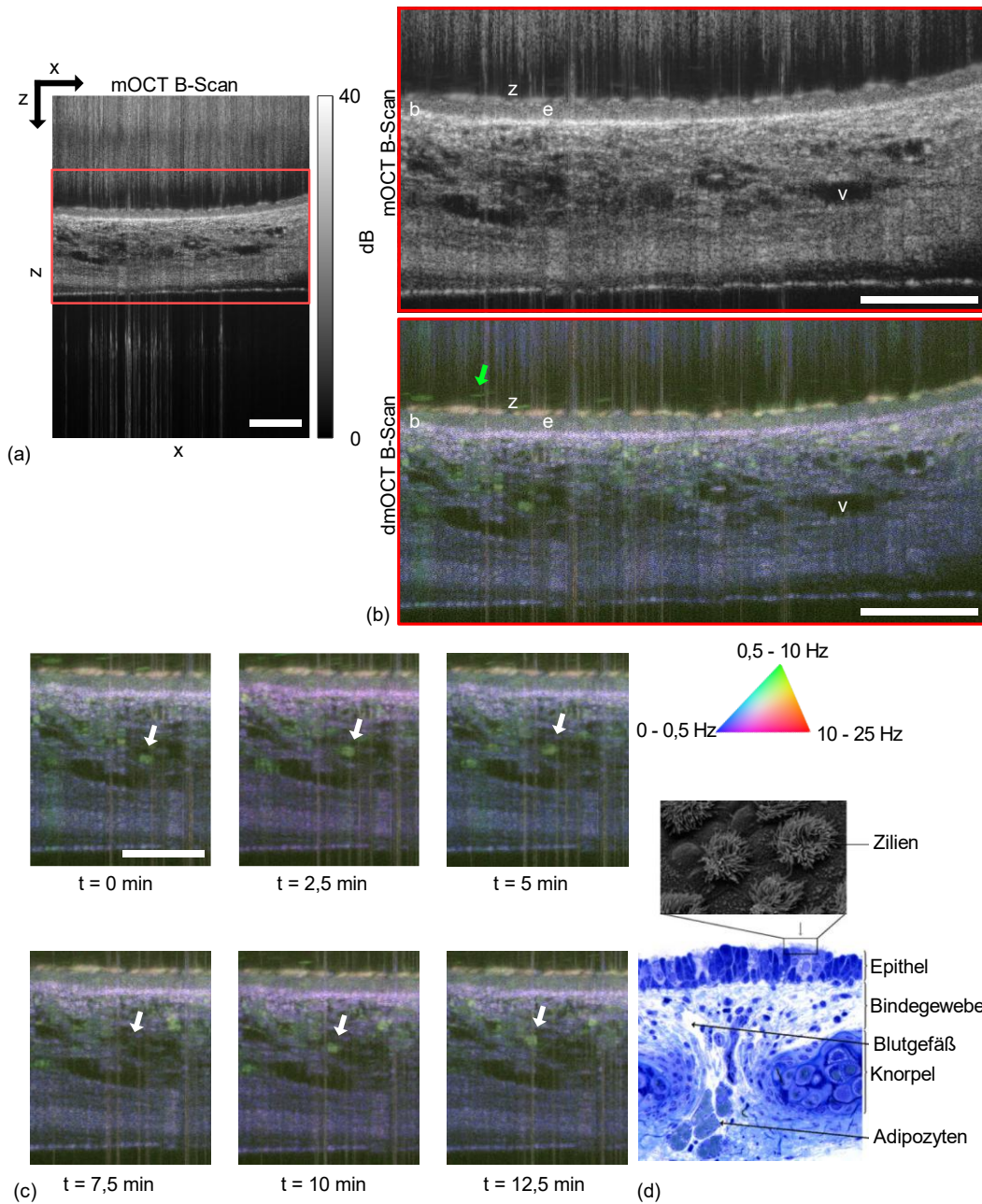


Abbildung 28: dmOCT B-Scan Zeitserie von ex vivo Mastrachea. Vergleich zu, mOCT B-Scan, REM-Aufnahme und H&E Färbung zeigt Zellbewegungen im Atemwegsgewebe. (a) gemittelter mOCT B-Scan mit vergrößerten Ausschnitt (rot) in (b, oben) und als dmOCT Auswertung (b, unten); Zilien (z), Epithelschicht (e), Bindegewebe (b) und Gefäße (v) sind erkennbar. (c) Exemplarische dmOCT Bildreihe desselben vergrößerten Ausschnitts zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die einzelnen Strukturen sind farblich deutlich voneinander trennbar. In der dmOCT-Bildreihe kann die Bewegung einer einzelnen Immunzelle in der Muskelschicht nachverfolgt werden (weißer Pfeil). Partikel bewegen sich über die Trachea und werden im dmOCT B-Scan als langegezogene Strukturen dargestellt (grüner Pfeil) (d) H&E-gefärbte Histologie eines Luftröhrenquerschnitts und Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von Zilien; Maßstabsbalken: 100 μm . Abbildung (d) adaptiert mit Genehmigung von [175] © The Optical Society

werden. Zilien werden in einem gelb-grünen Farbton dargestellt und entsprechen somit einer Überlagerung aus mittleren und schnellen Bewegungen im Bereich von 0,5 - 25 Hz. Unter den Zilien befinden sich in einem grünen Farbton angrenzend die Epithelzellschicht. Hierbei zeigt sich ein erster wesentlicher Unterschied zur OCT-Darstellung. In Abbildung 29 ist nur der Grünkanal dargestellt. Im FFT basierten dmOCT B-Scan könnten die Strukturen als einzelne Epithelzellen im Bereich des Fokus interpretiert werden (Abbildung 29, roter Kasten), die in der OCT-Darstellung durch Speckle-Rauschen überlagert werden. Dies würde die Zuordnung von Zilien zu einzelnen Epithelzellen ermöglichen. Dennoch könnte es sich hierbei auch um Schattenartefakte handeln, welche durch die Bewegung der Zilien hervorgerufen wird. Ähnlich zum OCT B-Scan stellt sich die Bindegewebsschicht durch eine helle Schicht unterhalb der Epithelzellschicht dar (Abbildung 28). Daran anschließend befindet sich das Muskelgewebe, welches sich in einem bläulichen Farbton darstellt. Innerhalb des Muskelgewebes können im Gegensatz zum OCT B-Scan verschiedene Zellen in einem grünen Farbton (Pfeil) identifiziert werden, die am ehesten Immunzellen entsprechen [177]. Über die gesamte Messzeit bewegen sich diese Zellen durch die obere Hälfte der Trachealwand. Die in Abbildung 28 (c) gekennzeichnete Zelle bewegt sich mit einer Geschwindigkeit von ca. $4 \mu\text{m}/\text{min}$ entlang des dmOCT B-Scans durch die Trachea. Die Geschwindigkeit wurde anhand der Positionsänderung der Zelle über den Messzeitraum bestimmt. Mittels Multiphotonenmikroskop wurden ähnliche Geschwindigkeiten für Immunzellen in den Atemwegen gemessen [178].

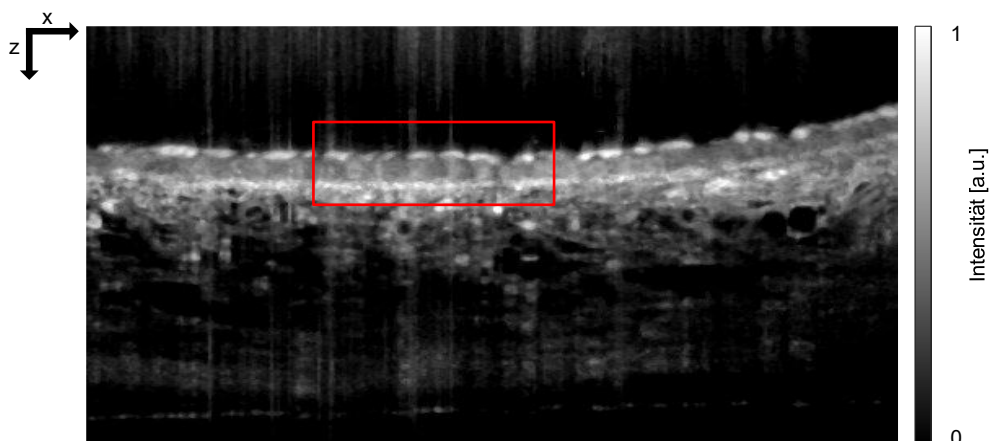


Abbildung 29: dmOCT B-Scan (FFT Grünkanal) von ex vivo Maustrachea - als Grauwertbild mit 2×2 Medianfilter und Kontrastanpassung. Einzelne Epithelzellen (rotes Rechteck) lassen sich möglicherweise voneinander unterscheiden und Zilien könnten somit Epithelzellen zugeordnet werden. Maßstabsbalken: $100 \mu\text{m}$

4.1.4 Zur Berechnung der Algorithmen zur dmOCT

Zur Darstellung von dmOCT-Daten wurden in dieser Arbeit die drei verschiedene Auswertungsmethoden zur Berechnung der Standardabweichung (STD), FFT basierte Farbkodierung (FFT) und Hauptkomponentenanalyse (PCA) evaluiert. Im Folgenden werden die verschiedenen Auswertemethoden anhand von exemplarischen Datensätzen von den drei Gewebetypen Mauszunge, -leber und -trachea *ex vivo* gegenübergestellt.

Anhand der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methoden zur dmOCT Auswertung sind in Abbildung 30 der gemittelte OCT B-Scan über den OCT-Datensatz (a - b), den dmOCT Ergebnissen (c - e) mit zugehöriger Frequenzanalyse einer ROI (f) aus dem Fokusbereich im Bereich der Basalmembran für die Aufnahme der Zunge (Kapitel 4.1.2) gegenübergestellt. Für die FFT basierte dmOCT wurde das RGB-Bild in ein Graustufenbild umgewandelt, um das Bild mit denen der anderen beiden Auswerteverfahren vergleichen zu können. Mit allen drei dmOCT Auswertemethoden werden zelluläre Strukturen rekonstruiert. Im Vergleich zur STD und FFT basierter dmOCT werden die Basalzellen in der PCA-Auswertung mit einem höheren Signal rekonstruiert. Anhand der Fourier-Analyse der Daten in Abbildung 30 (f) zeigt sich, dass die FFT in den höheren Frequenzbereichen Rauschen vergleichsweise stärker unterdrückt und niedrigere Frequenzen besser hervorhebt als STD und PCA basierter Auswertung zur dmOCT.

In Abbildung 31 sind die OCT- und dmOCT B-Scans von *ex vivo* Mausleber dargestellt. Der Datensatz besteht aus 150 B-Scans (500 x 1024 px) über einen Zeitraum von 1,38 s. Das Messfenster beträgt 500 x 660 μm^2 (xz). Die Nyquist-Abtastfrequenz betrug 54 Hz. In (a) ist der über den gesamten Datensatz gemittelte B-Scan über die gesamte Tiefe dargestellt. Abbildung 31 (b-d) zeigt wie in Abbildung 30 den relevanten Tiefenbereich mit den Auswertemethoden MEAN (b), STD (c), FFT (d) und PCA (e). Die sich in einer Tiefe von 200 μm befindende Unterseite der Glasplatte ist als helle Linie erkennbar. Die auf der linken Seite erkennbaren Streifenartefakte sind auf Scannerartefakte zurückzuführen. Direkt daran angrenzend befindet sich das Lebergewebe, welches sich in die Tiefe gehend mit abnehmender Intensität erstreckt. In der gemittelten B-Scan Aufnahme (a & b) kann das Gewebe nur als helle diffuse Struktur erkannt werden. In der dmOCT Auswertung (c-e) können einzelne Hepatozyten mit Zellgrenzen klar voneinander abgegrenzt werden. Es können in die Tiefe gehend mehrere Zellschichten differenziert werden, wobei die

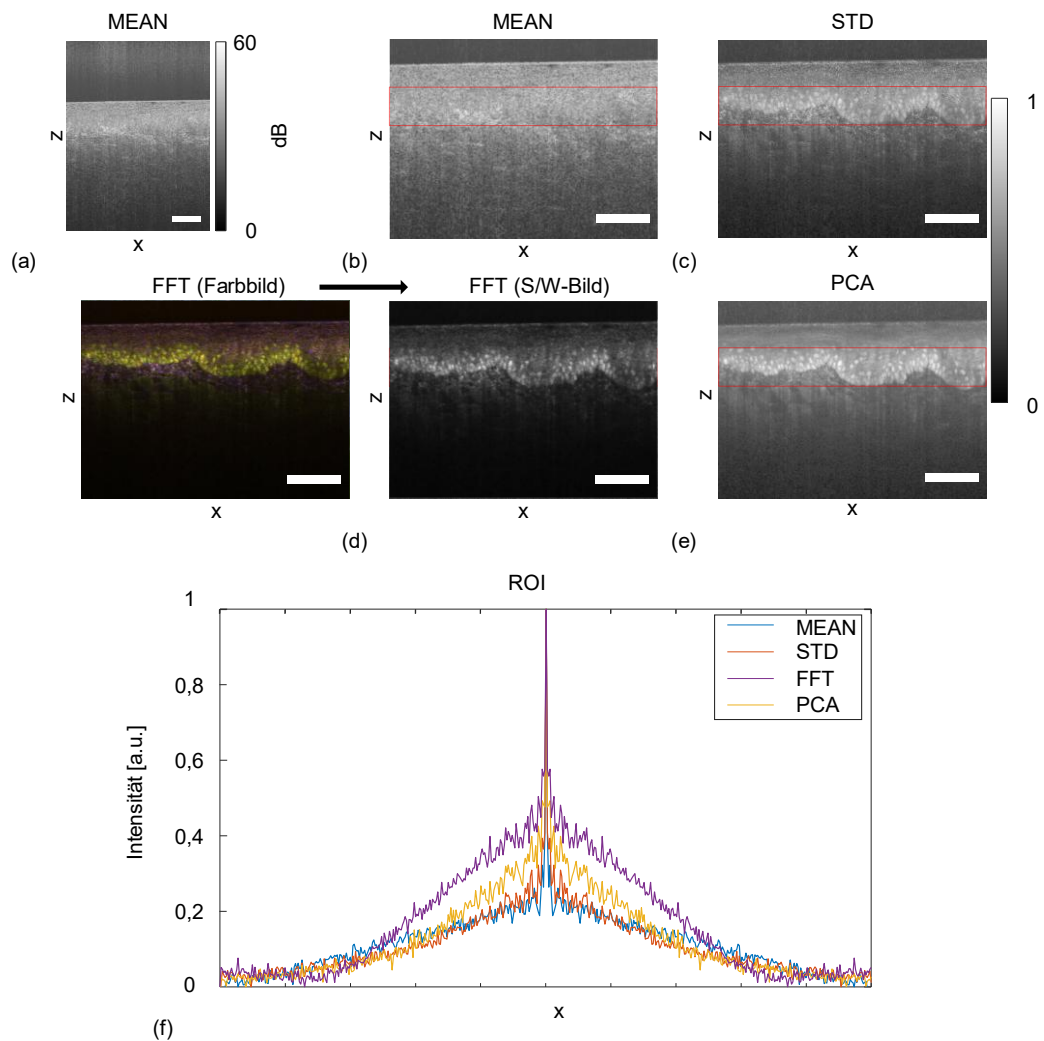


Abbildung 30: Vergleich drei versch. Alg. zur Berechnung von dmOCT Bildern der Zunge (a) Gemittelter B-Scan (b) Ausschnitt von (a) mit dem Bereich der Zunge unter dem Deckglas. (c-e) zeigen die Ergebnisse der drei unterschiedliche Auswertemethoden, bei denen im Gegensatz zum gemittelten B-Scan zelluläre Strukturen (b) sichtbar werden. Im Vergleich zur Standardabweichung (c) lassen sich Details bei der FFT (d) und der PCA (e) besser erkennen und das Rauschen nimmt ab. Teilabbildung (f) stellt die Fourier-Transformation entlang der x-Achse der Ausschnitte (b-e) gemittelt in einer ROI entlang der Tiefe z dar. Hierbei wird ersichtlich, dass die FFT über alle Raumfrequenzen höhere Intensitäten aufweist. Maßstabsbalken: 100 μm

Intensität abnimmt. In den Zellen können Zellkerne als in etwa 5 - 10 μm große dunklere runde Strukturen identifiziert werden. Die Hepatozyten weisen eine Ausdehnung von bis zu 50 μm auf. In (f) sind Spektren der Raumfrequenzen der vier Auswertemethoden (b-e) aus dem Fokusbereich (rotes Rechteck) als Diagramm dargestellt. Auch hier zeigt sich in der Fourier-Analyse (f) äquivalent, dass die über die FFT rekonstruierten dmOCT Bilder Strukturen mit höheren Raumfrequenzen besser rekonstruiert.

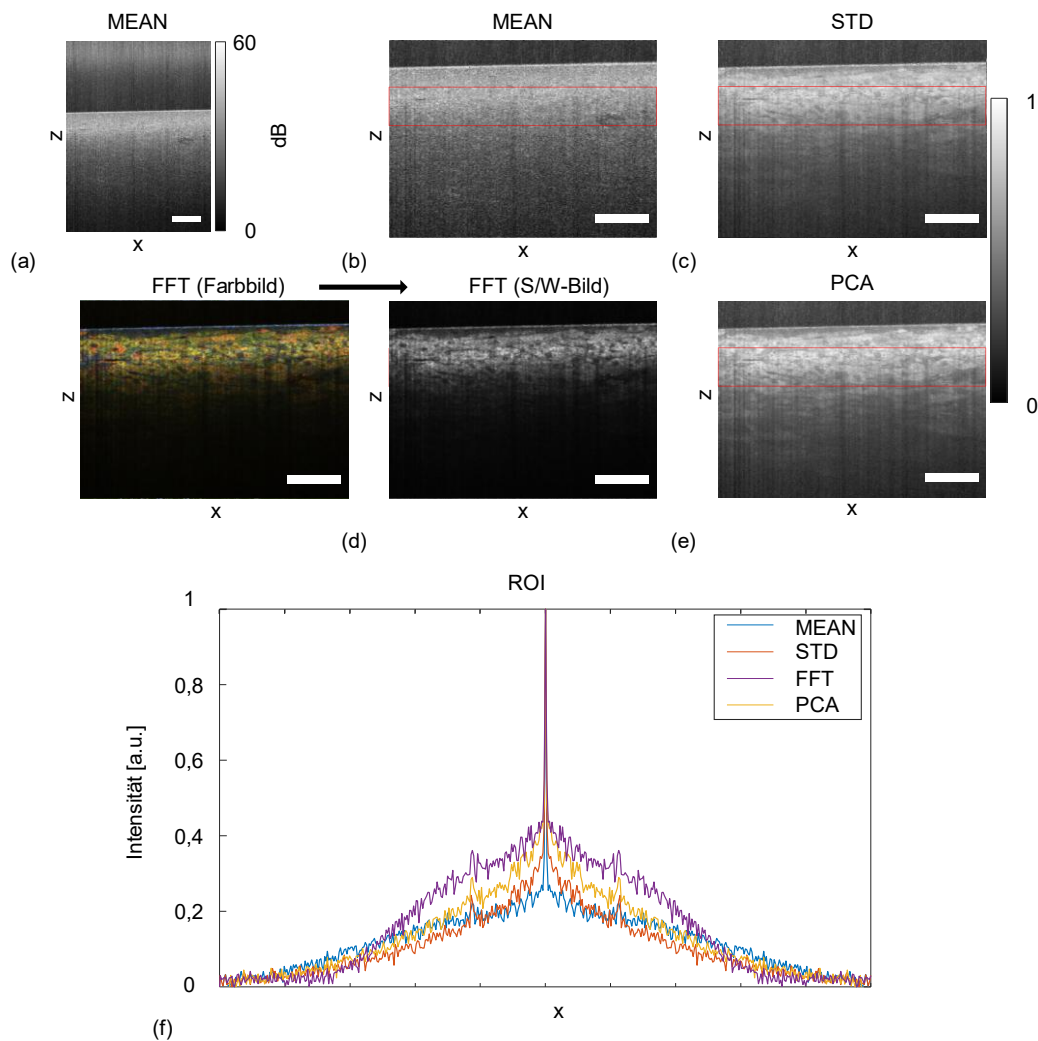


Abbildung 31: Vergleich drei versch. Alg. zur Berechnung von dmOCT Bildern der Leber (a) Gemittelter B-Scan von Mausleber (b) Ausschnitt von (a) mit relevanten Strukturen unter dem Deckglas (c-e) Standardabweichung (STD), FFT basierte dmOCT in Grauwertdarstellung und PCA-dmOCT desselben Ausschnitts zum Vergleich. dmOCT rekonstruiert Hepatozyten und einzelne Zellkerne (schwarze runde Strukturen) sowie Zellgrenzen. Im gemittelten mOCT B-Scan (a & b) können dagegen keine zellulären bzw. subzellulären Strukturen rekonstruiert werden. (f) stellt die Fourier-Transformation entlang der x-Achse der Ausschnitte (b-e) gemittelt in einer ROI entlang der Tiefe z dar. Die FFT-Auswertung kann höhere Raumfrequenzen wesentlich besser rekonstruieren. Maßstabsbalken: 100 μm

In Abbildung 32 ist die Auswertung des *ex vivo* an Trachea aufgenommenen Datensatzes aus dem Datensatzes (Kapitel 4.1.3) für einen exemplarischen B-Scan dargestellt. In (a und b) sind der gemittelte B-Scan und der relevante Tiefenbereich unter dem Deckglas dargestellt. (c-e) stellen wieder für die drei Algorithmen dmOCT Bilder und die zugehöriger Berechnung der Raumfrequenzspektrums im Fokus (f) einander gegenüber. In (b) der relevante Ausschnitt aus (a) dargestellt. Für die Auswertung der FFT basierten dmOCT wurde das RGB-Bild in ein Grauwertbild transformiert. Die Auswertungen zeigen

zwischen den drei Auswerteverfahren keine wesentlichen Unterschiede in der Bildqualität. In dem dmOCT B-Scan sind Immunzellen als grüne Strukturen im Bindegewebe der Trachea erkennbar. In den geplotteten Raumfrequenzen (f) werden niedrigere Frequenzen in der FFT-Auswertung besser rekonstruiert.

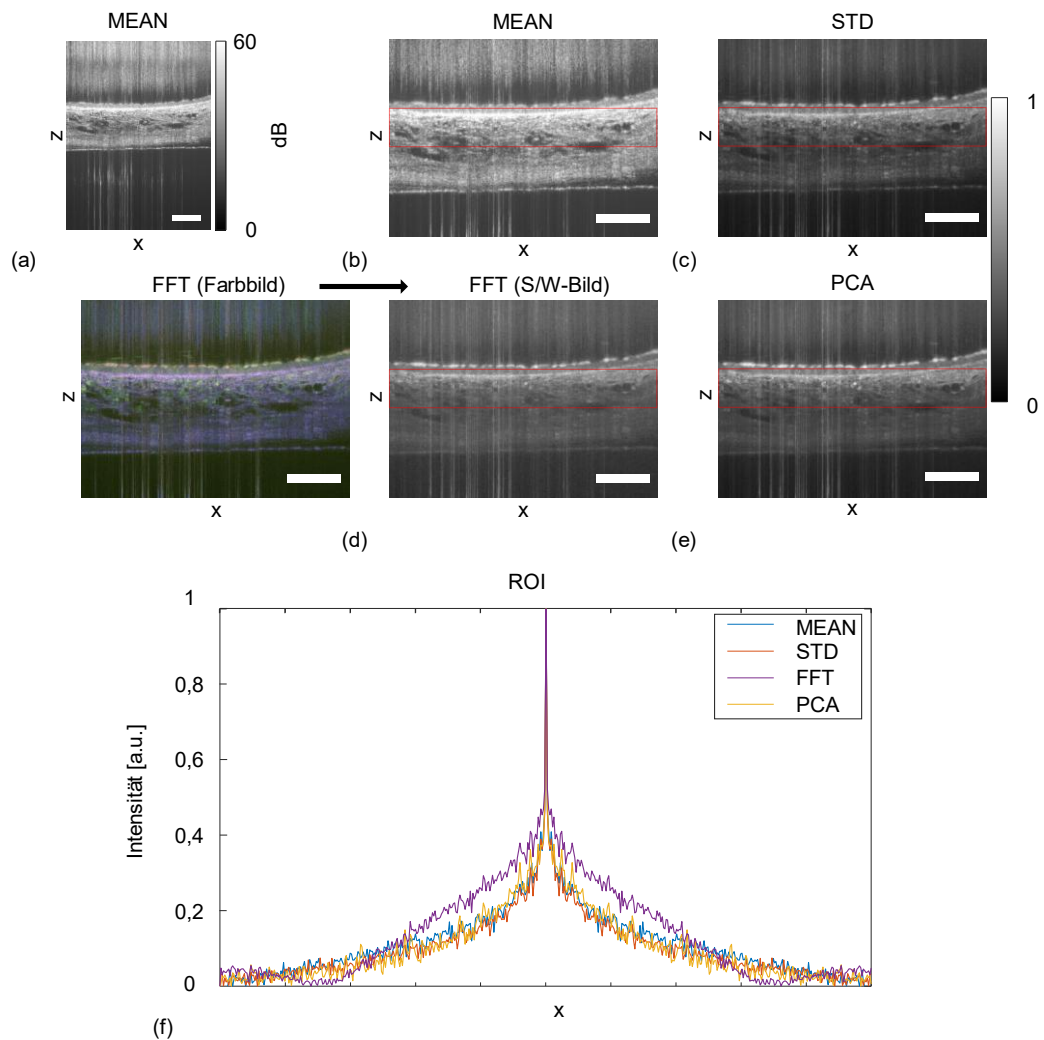


Abbildung 32: Vergleich drei versch. Alg. zur Berechnung von dmOCT Bildern der Trachea (a) gemittelter B-Scan von Trachea (b) Ausschnitt von (a) mit relevanten Strukturen (c-e) Standardabweichung (STD), FFT basierte dmOCT in Grauwertdarstellung (FFT) und PCA-dmOCT (PCA) desselben Ausschnitts zum Vergleich. (f) stellt die Fourier-Transformation entlang der x-Achse der Ausschnitte (b-e) gemittelt in einer ROI entlang der Tiefe z dar. Maßstabsbalken: 100 μm

4.2 Volumetrische mOCT mit 600 kHz A-Scan-Rate

Um die Bildgebungsgeschwindigkeit für schnelle Volumenaufnahmen zu optimieren, wurde die vom AIT entwickelte xposure-Zeilenkamera mit einer A-Scan-Rate von 600 kHz für die mOCT und dmOCT Bildgebung evaluiert. Da diese bisher noch nicht in der OCT eingesetzt wurde, musste zunächst eine Software zur Ansteuerung und Auswertung entwickelt werden. Im Folgendem wird die LabVIEW Software und Anbindung an die Kamerasoftware näher beschrieben. Anschließend erfolgte eine technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung im Vergleich zur OctoPlus-Zeilenkamera. Darauffolgend werden die mit der xposure-Zeilenkamera am mOCT durchgeführten Experimente und Ergebnisse behandelt.

4.2.1 Software zur Ansteuerung

Zur Übertragung und Speicherung der Daten der xposure-Zeilenkamera wurde von AIT ein Software-Entwicklungskit in C# bereitgestellt. Zur Ansteuerung der xposure-Zeilenkamera und des mOCT-Aufbaus, sowie zur Online-Prozessierung von OCT-Daten wurde ein LabVIEW (LabVIEW 2017, National Instruments, USA) Programm entwickelt. Dafür wurde die von AIT mitgelieferte C#-Kamerasoftware in ein LabVIEW Programm integriert, um die Kameradaten mit einer möglichst geringen Latenz mit einer graphischen Benutzeroberfläche prozessieren zu können. Um eine Echtzeit-Darstellung von B-Scans zu gewährleisten, wurde das Software-Entwicklungskit um eine C#-Bibliothek zur Übertragung der Kameradaten an das LabVIEW Programm erweitert. Die Bibliothek ermöglicht über das Inter-Process-Communication Protokoll ‚Memory-Mapped Files‘ die Übertragung von Kameradaten in das LabVIEW Programm. Die Kameradaten werden über die ‚Memory-Mapped-Files‘ Schnittstelle direkt im Arbeitsspeicher dem LabVIEW Prozess zur Verfügung gestellt.

Die Benutzeroberfläche des LabVIEW Programms ist in Abbildung 33 dargestellt. Im Front Panel der Software können verschiedene Scan-Modi eingestellt werden. Neben der Möglichkeit zum bidirektionalen- und unidirektionalen Scannen kann auch ein Sinus- und lineares Scanmuster anhand der vorgegebenen Parameter wie Größe des Messfeldes und Anzahl der abzutastenden Punkte (A-Scans) auf dem Messfeld eingestellt werden. Neben der Aufnahme und Darstellung von B-Scans können auch Volumen aufgezeichnet werden.



Abbildung 33: LabVIEW-Programm zur Ansteuerung der xposure-Zeilenkamera - Die grafische Benutzeroberfläche stellt alle Parameter auf der rechten Seite dar. Die Echtzeit B-Scan Visualisierung erfolgt auf der linken Seite. Daneben können einzelne A-Scans visualisiert werden und die Scan-Parameter für die galvanometrischen Scanner eingestellt werden. Auf der rechten Seite können die Scanparameter wie Anzahl der A-Scans, Größe des Messfeldes und Stitching mehrerer Volumen direkt modifiziert werden. Durch die Schaltfläche ‚Processing‘ wird die Online-Prozessierung zur Darstellung von A- und B-Scans aktiviert. Nach einer aufgezeichneten Messung können alle Metadaten über die Schaltfläche ‚Save for offline Processing‘ abgespeichert werden.

Der Tab-Bereich der Oberfläche erlaubt das Wechseln der Ansicht von der Darstellung von B-Scans zu einzelnen oder gemittelten A-Scans. Nach Einstellung aller Parameter kann eine Messung über die Schaltfläche ‚Scan‘ ausgelöst werden. Der Programmfluss des LabVIEW Programms basiert auf einem ereignisgesteuerten Zustandsautomaten. Bei der Programminitialisierung wird der Chirp-Vektor geladen und alle Variablen zur Prozessierung initialisiert. Da die xposure-Zeilenkamera über eine eingeschränkte Funktionalität des GenICam Standards [179] verfügt, konnten nur einzelne Funktionen der Zeilenkamera aus dem LabVIEW-Programm heraus eingestellt werden. Vor einer Messung muss die Anzahl an A-Scans in einem B-Scan mittels eigener Software der Zeilenkamera als Größe des zu übertragenden Kamerabildes angepasst werden. Ein B-Scan, bestehend aus einer vorgegebenen Anzahl von A-Scans entspricht einem zu übertragenden Kamerabild, welches aus der entsprechenden Anzahl von Zeilenscans besteht. Durch die Übertragung zusammengefasster Zeilenscans in Form eines Kamerabildes kann der Overhead beim Datentransfer zwischen Kamera und Computer effizient reduziert werden. Die in der LabVIEW Software von der Schnittstelle ausgelesenen Kamerabilder

werden in einer Queue zwischengespeichert, um sie anschließend weiterzuverarbeiten. Wird die Online-Prozessierung in der LabVIEW-Software aktiviert, werden die einzelnen A-Scans im Rohdatenbild über eine parallele Prozessierung auf der CPU nach der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methodik ausgewertet. Um sicherzustellen, dass die Prozessierung ohne spürbare Latenz nach Empfangen eines Rohdatenbildes durchgeführt wird, kann die Größe der Queue eingestellt werden. Der Start der Aufnahme sowie die Speicherung der Daten wurde über den Zeilentrigger nach Start in der LabVIEW Software ausgelöst. Um alle Metadaten einer Messung für die spätere Auswertung mit abzuspeichern, kann über die Schaltfläche ‚Save for offline processing‘ eine XML-Datei mit allen eingestellten Parametern der Messung angelegt werden. Am Analog-Ausgang der IO-Karte wurde die Steuerspannung für die galvanometrischen Scanner ausgegeben, deren Ausgabe zeitlich vom Trigger des Counter-Signals abhängig ist. Die Ausgänge wurden in der Oberfläche der LabVIEW Software im Tab-Bereich ‚Scan‘ eingestellt. Abbildung 34 stellt eine schematische Darstellung der erzeugten Spannungs-Ausgänge dar, um ein bi- und unidirektionale Scanmuster zu erzeugen. Bei einem unidirektionalen Scanmuster (a), wie es die ThorImage-Software verwendet, werden einzelne B-Scans vom selben Startpunkt ausgehend aufgezeichnet. Um ein räumlich möglichst äquidistantes Scanmuster zu erzeugen, werden während des nicht-linearen Anteils bei der Beschleunigung und dem

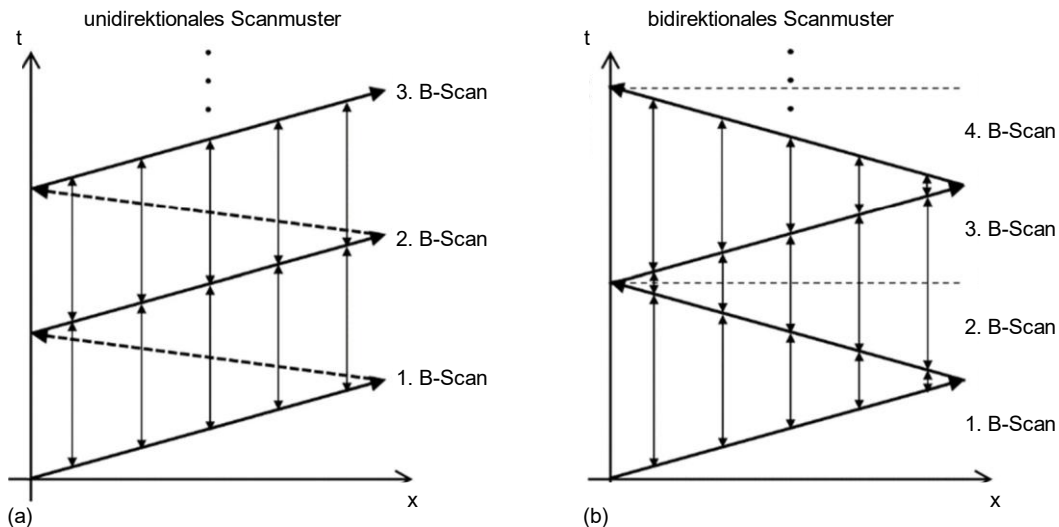


Abbildung 34: Schematische Darstellung von Scanmustern für die scanning OCT (a) Unidirektionales Scanmuster bei dem jeder B-Scan denselben Start- und Endpunkt hat. Flyback-Zeit entsteht durch die Bewegung des Scanners von End- zu Startpunkt zwischen zwei B-Scans (gestrichelte Linie). (b) Bidirektionales Scanmuster bei dem jeder zweite B-Scan entgegen der Richtung des vorherigen aufgezeichnet wird, wodurch die Flyback-Zeit reduziert wird. Im Vergleich zum unidirektionalen Scanmuster kann im bidirektionalen B-Scan Modus keine zeitlich-äquidistante Abtastung von Punkten gewährleistet werden (Pfeile). Nachgedruckt mit Genehmigung von [180] © The Optical Society

Abbremsen am Anfang und Ende der B-Scans und während der Flyback-Zeit keine A-Scans aufgezeichnet [180, 181]. Diese Totzeit-Zeit steigt mit Geschwindigkeit der Abtastung. In der ThorImage-Software wird dafür eine vorgegebene Anzahl von A-Scans eingerechnet, sodass sich die effektive B-Scan-Rate gegenüber der rechnerischen reduziert. Um eine höhere effektive Scan Rate zu erreichen, wurde für die xposure-Zeilenkamera ein bidirektionales Scanmuster implementiert (b). Durch die Beschleunigung und das Bremsen an den Umkehrpunkten zeichnen sich die B-Scans durch einen linearen Verlauf in der Mitte und einen nicht-linearen Verlauf an den Enden aus, wobei der lineare Anteil bei jedem benachbarten B-Scan leicht zueinander versetzt ist. Für die 4D OCT-Volumen-Aufnahmen wurden die Ränder beschnitten und die Zeilen manuell zueinander ausgerichtet. Für die dmOCT Volumenaufnahme wurde ein Deinterlacing-Algorithmus ‚vision.Deinterlacer‘ (Matlab Computer Vision Toolbox, Mathworks, USA) genutzt, um den Versatz automatisch anhand der dmOCT en face Bilder zu korrigieren. Dies ermöglicht im Falle von dmOCT Volumen-Aufnahmen, dass das gesamte Bildfeld trotz der nicht-linearen Abtastung für die Bildgebung genutzt werden kann.

4.2.2 Technische Charakterisierung der Bildgebungsleistung

Für den experimentellen Vergleich der Auflösung, des Roll-Off und der Sensitivität der mOCT-Systeme mit dem OctoPlus- und xposure-Spektrometer wurden verschiedene Messreihen aufgenommen. Die erzielten Ergebnisse werden mit den theoretisch maximal möglichen Werten verglichen. Messungen zur technischen Charakterisierung der Basler Sprint-Zeilenkamera sind bereits in der Dissertation von Hinnerk Schulz-Hildebrandt beschrieben worden [81].

Axiale Auflösung, Roll-Off und Sensitivität

Zur Bestimmung des Roll-Offs und der axialen Auflösung wurde ein Silberspiegel als Objekt im Fokus des Objektivs vermessen, der Referenzarm zur Aufnahme von möglichst äquidistanten Messpunkten verschoben und Signalhöhe sowie SNR bestimmt.

Abbildung 35 zeigt für das OctoPlus-Spektrometer acht Messungen des Spiegels mit variierten Referenzarmlängen, die sich über den gesamten Tiefenmessbereich von 860 μm erstrecken. Das maximale Signal von 62 dB wurde in einer Tiefe von ca. 100 μm

und das minimale mit 52,7 dB in einer Tiefe von ca. 800 μm gemessen. Der Roll-Off zwischen erster und letzter Messung beträgt somit 9,3 dB.

Die axiale Auflösung wurde anhand der 1. Messung in einem Tiefenbereich von 100 μm mit 1,9 μm bestimmt. Für die 860 μm Messbereich ergibt sich bei der verwendeten Hann-Fensterung eine theoretisch erreichbare Auflösung von 1,7 μm .

Der Untergrund bei einer Signaltiefe von 700 bis 860 μm ergibt sich aufgrund der Unterabtastung des gechirpten Signals. Auffallend ist auch der zu höheren Tiefen abfallende Rauschuntergrund, welcher durch spektrales Rauschen der Superkontinuum-Lichtquelle hervorgerufen wird. Das Untergrundrauschen fällt von knapp 15 dB auf 0 dB über den Tiefenmessbereich ab.

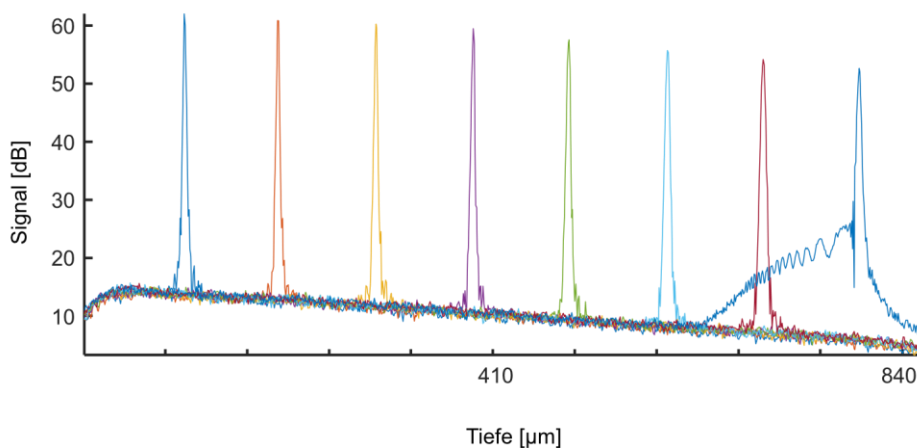


Abbildung 35: Messung von SNR und Roll-Off des OctoPlus-Spektrometers - A-Scans mit dem Signal einer reflektierenden Oberfläche, die in verschiedenen Tiefen positioniert wurde (248.000 A-Scans/s). Der Roll-Off zwischen 1. und 8. Messung beträgt 9,3 dB. Artefakte bei höherer Abbildungstiefe sind auf eine Unterabtastung in Teilen des Spektrums zurückzuführen, die aufgrund des breiten Spektralbereichs eingefaltet wird.

Abbildung 36 stellt die Ergebnisse der SNR-Messung für das xposure-Spektrometer an 10 äquidistanten Tiefenpositionen dar. Der Tiefenmessbereich beträgt ca. 840 μm . Das maximal erreichbare Signal beträgt 56 dB in einer Messtiefe von 90 μm und das in einer Messtiefe von ca. 820 μm gemessene Minimum bedingt durch den Roll-Off 44 dB. Für das xposure-Spektrometer ergibt sich aus der Differenz des Maximums zum Minimum ein Roll-Off von 12 dB. Deutlich ersichtlich ist hierbei auch die Einfaltung des OCT-Signals im Messbereich zwischen 630 μm und 840 μm . Des Weiteren lässt sich ebenfalls ein entlang der Messtiefe ein um 5 dB abfallendes Rauschniveau erkennen.

Die maximal erreichbare axiale Auflösung wurde bei einer Tiefe von etwa 100 μm bestimmt und beträgt 1,8 μm in Luft. Dies entspricht fast dem theoretisch erreichbaren Wert von 1,7 μm . Auffällig ist ein um bis zu 10 dB deutlich höheres RIN bei dem OctoPlus-Spektrometer im Vergleich zum xposure-Spektrometer, was auf die höhere FWC der OctoPlus-Zeilenkamera und damit verbundenes Rauschen durch die Lichtquelle zurückzuführen ist. Der Roll-Off des xposure-Spektrometers ist um ca. 3 dB höher als beim OctoPlus-Spektrometer. Generell lässt sich das OctoPlus-Spektrometer gegenüber dem xposure-Spektrometer wesentlich einfacher justieren und vermessen, da die Größe der Pixel eine Fokussierung des Lichts auf die Zeilenkamera erleichterte. Insbesondere bei einer Ausleserate von 600 kHz bei der xposure-Zeilenkamera hatte eine Erwärmung der

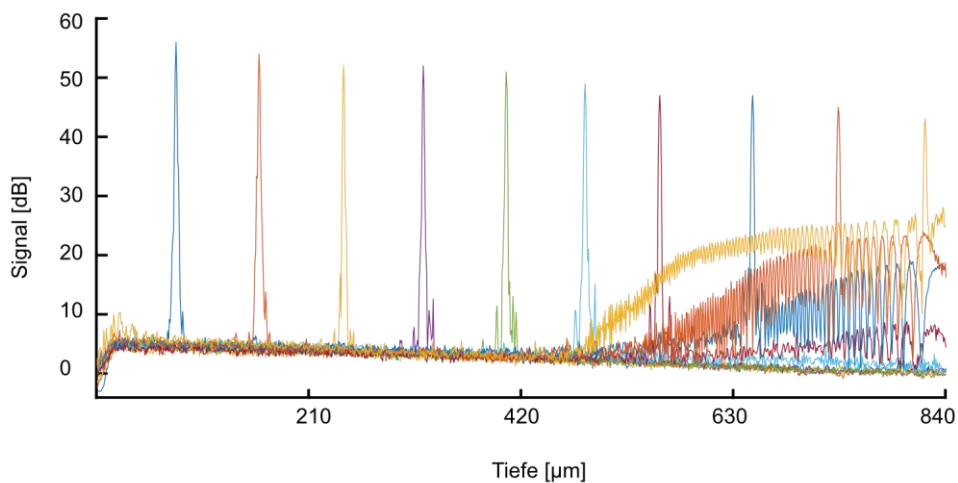


Abbildung 36: SNR und Roll-Off des xposure-Spektrometer - A-Scans mit dem Signal einer reflektierenden Oberfläche, die in verschiedenen Tiefen positioniert wurde (600.000 A-Scans/s, 1,1 μs Belichtungszeit). Der Roll-Off beträgt 12 dB über den gesamten Messbereich. Artefakte bei höherer Messtiefe sind auf eine Unterabtastung in Teilen des Spektrums zurückzuführen.

Zeilenkamera Auswirkung auf die Justierung des Spektrometers, welches durch eine damit einhergehenden Verschiebung des Fokus auf den Sensor der Zeilenkamera ersichtlich wurde. Bei einer A-Scan-Rate von 600 kHz und bei voller Referenzarmleistung konnte die xposure-Zeilenkamera nicht mehr voll durch die Referenzarmstrahlung angesteuert werden, wodurch nicht das maximal mögliche SNR erreicht werden konnte. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Sensitivität der beiden Spektrometer wurde ein Keilprisma mit bekannter Reflektivität als Messobjekt im Fokus des Objektivs bei verschiedenen A-Scan-Raten vermessen. Die Referenzstrecke wurde so angepasst, dass das Signal in einer Tiefe von 100 μm aufgezeichnet wurde, um den Einfluss des Roll-Off zu minimieren. Die experimentelle Sensitivität wurde über die Gleichung 3.1 bestimmt. Anhand von Gleichung 2.43 wurde die theoretisch erreichbare Sensitivität bei den jeweiligen A-Scan-Raten bestimmt. Der Strahlungsfluss betrug 10 mW und die Quanteneffizienz der xposure-Zeilenkamera beträgt 35 %. Die Quanteneffizienz der OctoPlus-Zeilenkamera wurde im Mittel mit 47,5 % und die Photonenenergie wurde für eine Wellenlänge von 750 nm berechnet. Die Belichtungszeiten ergeben sich aus den Kehrwerten der A-Scan-Rate. Tabelle 3 listet die gemessenen Sensitivitätswerte in Abhängigkeit zur A-Scan-Rate des OctoPlus-Spektrometers für 7 A-Scan-Raten auf. Bei einer maximalen A-Scan-Rate von 248 kHz wurde die experimentelle Sensitivität mit 87,1 dB bestimmt. Mit abnehmender A-Scan-Rate nimmt die Sensitivität um 22,2 dB bis zu einer maximal gemessenen Sensitivität 109,3 dB bei 5 kHz zu. Anhand von Gleichung

Tabelle 3: Sensitivität in Abhängigkeit zur A-Scan Rate für das OctoPlus-Spektrometer

A-Scan Rate [kHz]	Sensitivität [dB]	
	gemessen	theoretisch
5	109,3	125,5
10	109,1	122,5
25	106,5	118,6
50	98,8	115,5
100	96,4	112,5
200	88,6	109,5
248	87,1	108,6

2.43 wurde die theoretisch erreichbare Sensitivität bestimmt. Die Differenz aus experimenteller und theoretischer Sensitivität bei einer A-Scan-Rate von 5 kHz betrug 16,2 dB und im Mittel über alle A-Scan-Raten 16,7 dB.

Tabelle 4 listet die Ergebnisse der Sensitivitätsmessung in Abhängigkeit zur A-Scan-Rate von 25 kHz bis 600 kHz an 8 A-Scan-Raten des xposure-Spektrometers auf. Bei einer A-Scan-Rate von 25 kHz wurde die höchste Sensitivität mit 95,2 dB bestimmt. Mit zunehmender A-Scan-Rate nimmt die Sensitivität um 13,5 dB auf 81,7 dB bei 600 kHz A-Scan-Rate ab. Die theoretisch maximal erreichbare Sensitivität für das xposure-Spektrometer beträgt 117,2 dB bei einer A-Scan-Rate von 25 kHz. Die Differenz aus experimenteller und maximal theoretisch erreichbarer Sensitivität bei den jeweiligen A-Scan-Raten betrug im Mittel 15,5 dB.

Für das OctoPlus-Spektrometer ergibt sich eine theoretische Sensitivität bei gleicher A-Scan-Rate von 25 kHz von 118,6 dB. Der Vergleich der beiden Messungen zur Sensitivität der Spektrometer macht deutlich ersichtlich, dass das OctoPlus-Spektrometer eine im Durchschnitt 11,3 dB höhere experimentelle Sensitivität bei allen A-Scan-Raten bietet.

Tabelle 4: Sensitivität in Abhängigkeit zur A-Scan Rate für das xposure-Spektrometer

A-Scan Rate [kHz]	Sensitivität [dB]	
	gemessen	theoretisch
25	95,2	117,2
50	94,0	114,2
100	92,7	111,2
200	89,7	108,2
300	87,9	106,4
400	85,0	105,2
500	78,6	104,2
600	81,7	103,4

Laterale Auflösung & Bildfeld

Zur Bestimmung der lateralen Auflösung wurde ein OCT-Volumen mit einem Air Force Target als Messobjekt im Fokus mit dem xposure-Spektrometer aufgenommen. Als Immersionsmedium zwischen Objektiv und Probe wurde Wasser verwendet. Es wurde ein bidirektionales Scanmuster bei maximaler A-Scan-Rate von 600 kHz genutzt. Durch die Messung wurde geprüft, inwieweit bidirektionales Scannen bei einer hohen A-Scan-Rate Scanartefakte durch nicht-lineare Abrasterung zwischen nebeneinanderliegenden B-Scans hervorrufen kann. In Abbildung 37 (a) sind Gruppe 6 bis Gruppe 9 als Maximumintensitätsprojektion des Volumens des Air Force Targets entlang der z-Achse dargestellt. Gruppe 8 ist bis zu Element 6 vollständig auflösbar. Bei den Elementen in Gruppe 9 fällt auf, dass horizontal angeordnete Elemente nicht mehr auflösbar sind, wohingegen vertikale Elemente bis Element 2 voneinander unterscheidbar sind. Die Linien in Element 1 aus Gruppe 9 enthält 512 Anzahl von Linienpaaren/mm, d. h. Linienbreite und Abstand betragen jeweils $0,97 \mu\text{m}$ [182]. Die lateral theoretisch erreichbare Auflösung bei einer zentralen Wellenlänge von 750 nm und einer $NA = 0,3$ nach Gleichung 2.46 beträgt $0,925 \mu\text{m}$. In Abbildung 37 (b) ist die Ableitung der Kantenspreizfunktion (engl. edge spread function) einer Messung an der Kante eines Gitterstrichs dargestellt. Nach einem Gauß-Fit an die Ableitung der so bestimmten Line-Spread Funktion wurde die FWHM mit $1,3 \mu\text{m}$ bestimmt.

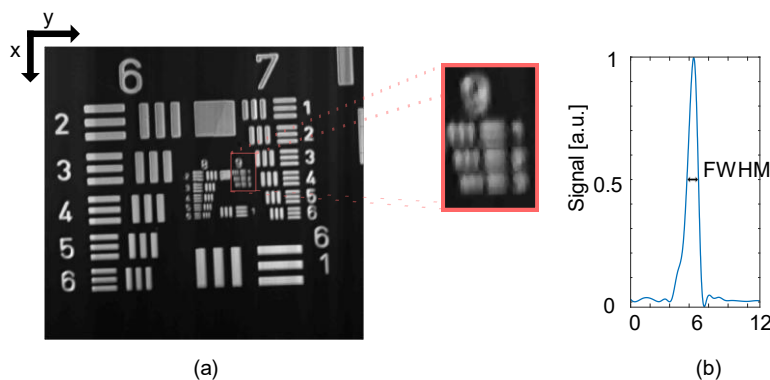


Abbildung 37: Laterale Auflösung des mOCT-Aufbaus mit Wasserimmersionsobjektiv ($NA=0.3$). (a) Abbildung der hochauflösenden USAF Auflösungsstestplatte. Die x-Richtung entspricht der schnell scannende Achse und die y-Richtung der langsam scannenden Achse. Alle Gruppen bis einschließlich Gruppe 9 Element 3 (vertikale Elemente) sind scharf abgebildet. Horizontale Elemente in Gruppe 9 sind durch Aberrationen unscharf. (b) An der Kante eines Gitterstrichs gemessene Ableitung der Kantenspreizfunktion (FWHM) beträgt: $1.3 \mu\text{m}$

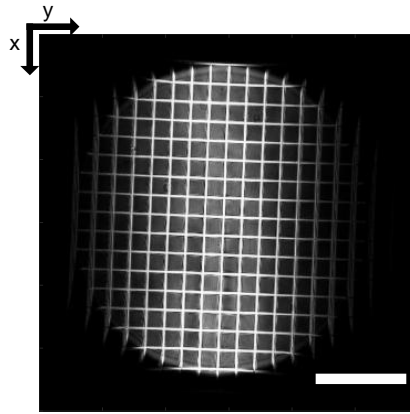


Abbildung 38: Bestimmung des Bildfelds des mOCT-Aufbaus mit dem verwendeten Wasserimmersionsobjektiv (Leica 10x/0,3 NA). Die Abbildung eines optischen Gitters zeigt ein Bildfeld mit 1,7 mm Durchmesser. Es ist eine starke Vignettierung entlang der y-Achse ersichtlich. Maßstabsbalken: 500 µm

Die Größe des maximal möglichen Bildfeldes wurde anhand eines Kreuzgitters mit 100 µm Linienabstand im Fokus des Leica 10x/0,3 NA Mikroskopobjektivs bestimmt. Die Maximalintensitätsprojektion über 20 en face Ebenen aus dem Fokusbereich entlang der Tiefe ist in Abbildung 38 dargestellt. Das Bildfeld hat einen Durchmesser von 1,7 mm. In der Abbildung ist eine ovale Vignettierung erkennbar. Durch die Abbildung der Aperturebene des Objektivs auf den schnellen Scanner (x-Achse) wird das Objekt nur in dieser Achse vignettierungsfrei dargestellt. Für die OCT und dmOCT-Messungen wurden hauptsächlich Messungen mit einer Länge von 500 µm entlang der schnell scannenden Achse (x) durchgeführt. Um Vignettierungseffekte zu vermeiden, wurde die Messungen bei der zentralen Position der y-Achse aufgezeichnet.

4.2.3 4D Darstellung dynamischer Transportvorgänge der Trachea

Die Kombination aus hoher Auflösung und hoher Geschwindigkeit des xposure-Spektrometers wurde zur Untersuchung des durch Zilien angetriebenen Schleimtransports auf den Luftwegen an *ex vivo* Trachea eingesetzt. Es wurde ein Datensatz besteht aus 119 Volumen über einen Zeitraum von ca. 10 Sekunden aufgenommen (Abbildung 39). Die Volumen wurden bei einer Abtastrate von 12 Hz mit 500 x 100 x 1024 Voxel (xyz) durch bidirektionales Scannen entlang der x-Achse aufgezeichnet. Für eine räumlich äquidistante Abtastung und Reduktion von bidirektionalen Scanartefakten wurde das Volumen auf 334 x 200 x 1024 Voxel (xyz) in y interpoliert und in x beschnitten. Die Volumengröße betrug dann 250 x 150 x 840 µm³ und wurde für eine bessere Visualisierung in die Tiefe z auf 250 x 150 x 250 µm³

beschnitten. Volumen, wie dieses ermöglichen es dynamische Vorgänge dreidimensional aufzunehmen, um somit komplexe Zusammenhänge zu beobachten. In B-Scans der aufgezeichneten Volumina ist es schwierig, dass durch Zilientransport hervorgerufene komplexe Bewegungsverhalten der Partikel zu verfolgen. Sie bewegen sich in den B-Scan hinein und aus ihm heraus (Abbildung 39, a), und eine Charakterisierung ihrer Trajektorien wäre allein über B-Scans nicht möglich. In früheren Arbeiten limitierte die maximale Abtastrate die Aufnahme ausschließlich auf B-Scans [81]. Im Gegensatz dazu konnte aus dem mit der neuen Kamera aufgenommenen Volumen die komplette Trajektorie der Partikel quantifiziert werden (Abbildung 39, b).

Die Maximum-Intensitäts-Projektion der Volumina zeigt nicht nur Partikel, sondern auch einzelne Epithelzellen, die anhand der Epithelzellgrenzen unterscheidbar sind. Flimmerhärchen sind nicht direkt sichtbar, können aber indirekt anhand von schnellen Signalfuktuationen in den B-Scans und Volumen über die Zeit identifiziert werden. Das SNR war ausreichend für die Darstellung der gesamten Dicke der murinen Atemwege. Drüsen, Gefäße und Epithelzellschicht auf der Außenseite der Trachea sind zudem sichtbar. Die Partikel erscheinen kontrastreich als kleine Kugeln in der Fokusebene und als

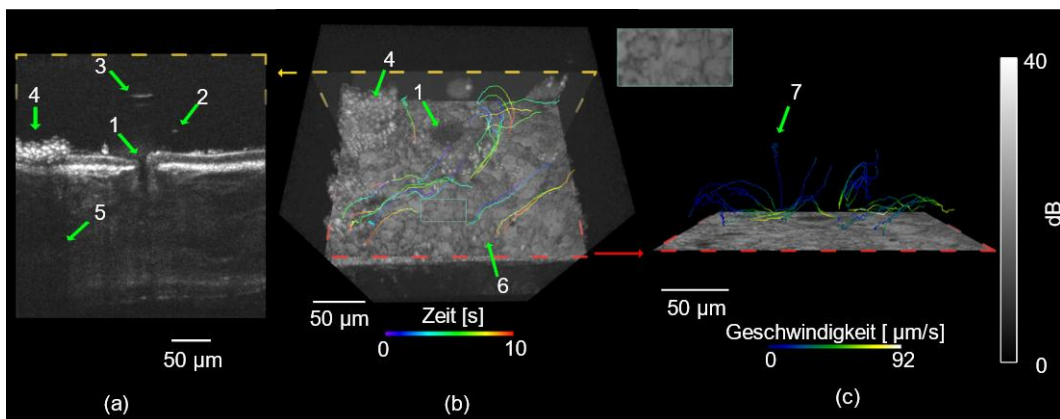


Abbildung 39: 4D OCT-Aufnahme von ex vivo Mastrachea. (a) Gemittelttes Bild aus fünf benachbarten B-Scans einer Aufnahme. Verschiedene Strukturen des Trachealgewebes wie Drüsenkanal (1), Epithel und subepitheliales Gewebe sind sichtbar. Aufgrund der Defokussierung erscheinen einzelne Partikel in der Nähe der Fokusebene als kleine Punkte (2) und oberhalb der Fokusebene seitlich ausgedehnt (3). Eine größere Anzahl abgelagerter Partikel (4) ist auf der linken Seite des B-Scans sichtbar. Die Partikel schatten die unteren Gewebestrukturen ab (5). Die äußere Oberfläche der Luftröhre ist am unteren Rand des Bildes sichtbar. (b) Maximumintensitätsprojektion eines mOCT-Volumens. Die Überlagerung der Partikeltrajektorien zeigt die komplexe dreidimensionale Bewegung von 25 Partikeln, die aus der Abfolge der aufgenommenen Volumina berechnet wurde. Unterhalb der Trajektorien sind einzelne Zellen der Epithelzellschicht mit deutlicher Abgrenzung ihrer Grenzen zu erkennen (6). (c) Seitenansicht der verfolgten Partikel mit farbkodierter Partikelgeschwindigkeit. Die Partikel werden in der Nähe des Epithels beschleunigt, steigen nach oben und fallen zurück zum Epithel (7), wo sie durch die Ziliartätigkeit erneut beschleunigt werden. Die Größe des beschnittenen Volumens betrug $250 \times 150 \times 270 \mu\text{m}^3$ (xyz). Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$.

scheibenförmige verschmierte Strukturen außerhalb des Fokus (Abbildung 39, a und b). Der Einfluss der Defokussierung ist direkt sichtbar, wenn sich die Partikel in Richtung des Epithels bewegen. Die Partikel bewegen sich in diagonaler Richtung von oben rechts nach unten links in unterschiedlichen Abständen von bis zu 200 μm von der Oberfläche. Eine Ansammlung von Partikeln blockiert den Partikeltransport in der oberen linken Ecke des Volumens. Partikel, die weiter von der Oberfläche entfernt sind, bewegen sich langsamer, während Partikel nahe der Oberfläche höhere laterale Geschwindigkeiten aufweisen. Auch in der Nähe der Gewebeoberfläche wurden stationäre Partikel beobachtet. Der Grund dafür könnte entweder ein Mangel an Ziliarbewegung der Epithelzellen oder eine übermäßige Ansammlung von Partikeln sein.

Zur quantitativen Auswertung der Partikelbewegung wurde die automatische Partikelverfolgung der Software Imaris 9.2 (Bitplane, USA) verwendet, welche die Partikelbewegung in drei Dimensionen über die Zeit quantitativ verfolgte. Insgesamt wurden 25 einzelne Partikel ausgewertet, deren Wege in (Abbildung 39, b und c), farblich kodiert dargestellt sind. Die maximale Partikelgeschwindigkeit im Volumen betrug 91 $\mu\text{m/s}$ bei einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 26 $\mu\text{m/s}$ und einer Standardabweichung von 13 $\mu\text{m/s}$. Für die einzelnen Partikel variiert die Geschwindigkeit beträchtlich. Es wurde eine Beschleunigung in der Nähe des Epithels und eine Verlangsamung und sogar ein Anhalten in größerer Entfernung von der Gewebeoberfläche beobachtet. Die maximale Geschwindigkeit hatten die Partikel nach der Beschleunigung im Bereich der Flimmerzellen. Die Korrelation zwischen Geschwindigkeit und Abstand der Partikel von den Ziliarzellen ist in (Abbildung 39, c) gut sichtbar.

4.2.4 Volumetrische dmOCT

Die hohe Aufnahmegeschwindigkeit der xposure-Zeilenkamera ermöglicht es Volumen mit einer Abtastrate von einigen zehn Hertz aufzunehmen. Dies eröffnet die Möglichkeit einer auf Volumensequenzen basierenden dmOCT. Die wurde an murinem Lebergewebe ex vivo evaluiert und konnte die Aufnahmezeit von mehreren Minuten auf 41.6 Sekunden reduziert werden. Die bei einer A-Scan-Rate von 600 kHz aufgenommenen Volumen wurde ohne Fixierung des Deckglases mit einer in einer Petrischale gelagerten Probe aufgezeichnet. Das detektierte Volumen hatte eine Größe von 500 x 500 x 1024 Voxel

(xyz) bei $300 \times 300 \times 840 \mu\text{m}^3$ (xyz) und bestand aus 10 aneinandergrenzenden Subvolumen. Zur besseren Darstellung wurde das gesamte Volumen auf eine Tiefe von $160 \mu\text{m}$ zugeschnitten. Das Volumen und ein ausgewähltes en face mOCT- und dmOCT-Bild sowie eine dmOCT B-Scan Aufnahme sind in Abbildung 40 dargestellt. Der Fokus des Objektivs befindet sich ca. $50 \mu\text{m}$ unterhalb der Oberfläche des Lebergewebes. Es wurden dabei Subvolumen mit je $500 \times 50 \times 1024$ (xyz) Voxel 100-mal mit einer Abtastfrequenz von 24 Hz aufgezeichnet. Die Aufnahmezeit für ein Subvolumen betrug somit 4,16 s. In der Volumendarstellung (a) kann die Schicht der Glissonsche Kapsel (G), welche die Leber einhüllt, in einem blauen Farbton identifiziert werden. Am Anfang der Messung, bzw. während der Aufnahme des ersten Subvolumens, erscheint die Farbe die

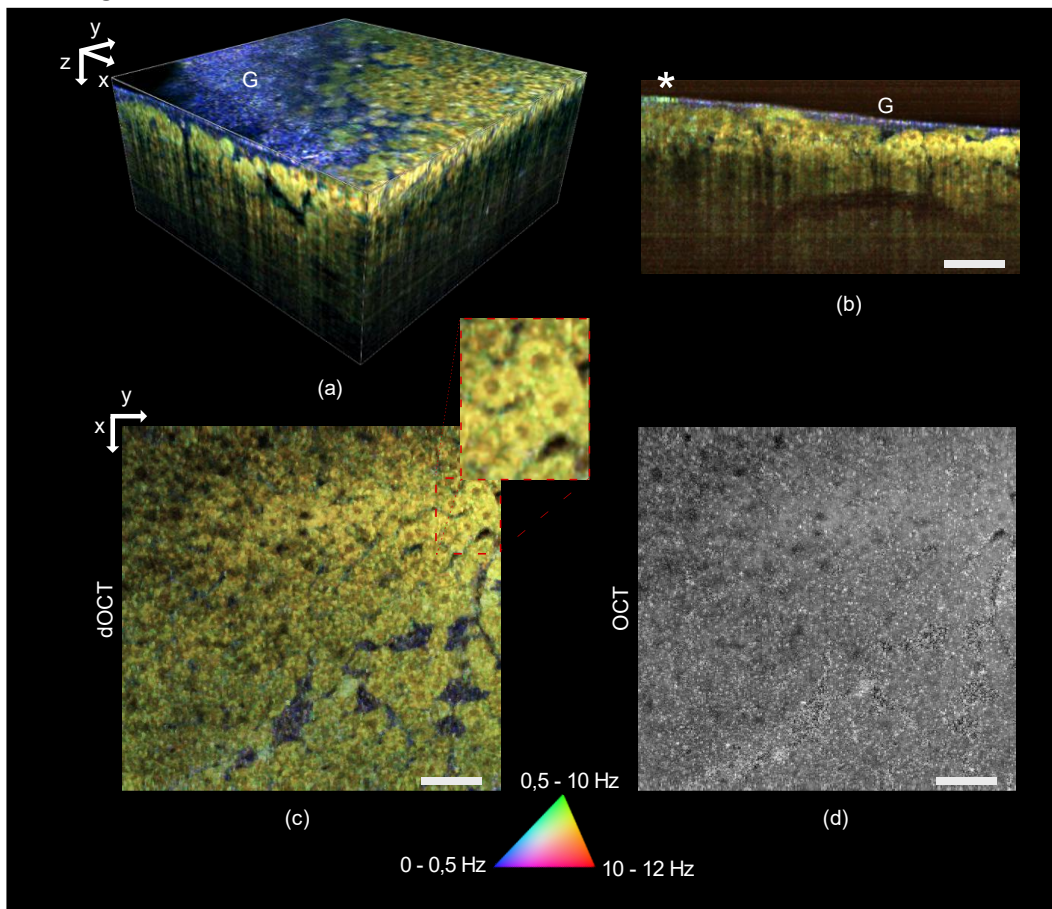


Abbildung 40: Volumetrische dmOCT-Bildgebung an ex vivo Mausleber. Die Größe des gemessenen Volumens betrug $300 \times 300 \times 840 \mu\text{m}^3$ (xyz). Das Volumen (a) ist zur besseren Darstellung in z beschnitten. (b) Aus den dmOCT-Volumen extrahierter B-Scan, welcher orthogonal zur schnellen Scanachse liegt. Ein Artefakt aufgrund von Gewebewebungen ist durch eine Farbveränderung der Gewebeoberfläche erkennbar (*), (c). En face dmOCT Bild in $60 \mu\text{m}$ Tiefe unter der Oberfläche. Hepatozyten werden durch den dynamischen OCT-Kontrast sichtbar und können durch Zytoplasma (grün) und Zellkerne (rot) identifiziert werden. Die Bindegewebsschicht (Glissonsche Kapsel, G) ist blau (d) Im entsprechenden gemittelten OCT-Bild sind die zellulären Strukturen kaum sichtbar. Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$

Trennschicht von Gewebe zu Luft in einem anderen Farbton (*) was auf Bewegungen während der Aufnahme schließen lässt. Darunter befinden sich die Hepatozyten. Das Zytoplasma der Hepatozyten erscheint in einem grünen Farbton und einzelne Zellen im Fokus können noch anhand ihrer Zellgrenzen identifiziert werden. In der dmOCT B-Scan und dmOCT Volumen Darstellung (b & d) sind Zellkerne in Rot identifizierbar. Kernkörperchen sind aufgrund von Bewegungsartefakten und der geringeren Sensitivität der xposure-Zeilenkamera innerhalb der Zellkerne nicht mehr erkennbar. In der gemittelten en face mOCT-Bild (d) sind keine zellulären Strukturen erkennbar. Im dmOCT B-Scan (b) können Zellen noch bis zu einer Tiefe von 100 µm unterhalb der Oberfläche dargestellt werden. In einer Tiefe von 100 - 150 µm befindet sich ein Hohlraum (schwarz), der entweder ein Blut- oder Lymphgefäß zuzuordnen ist. In der en face dmOCT Aufnahme zeigt sich, dass nicht über die gesamte Querschnittsfläche (c) Zellen mit Zellkernen dargestellt werden können. Erst durch die Nutzung des dOCT-Kontrastes werden zelluläre und subzelluläre Strukturen sichtbar. Der Verzicht auf eine Fixierung der Probe in der Petrischale führt im Vergleich zu den Messungen in Kapitel 5.1.2 zur stärkeren Bewegungsartefakten, welche als unschärfere Zellgrenzen im Vergleich zu den dort fixierten Proben sichtbar sind.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die von der Arbeitsgruppe um C. Boccara unter der Bezeichnung ‚dynamic OCT‘ veröffentlichte Methode zur Kontraststeigerung bei der OCT-Bildgebung zellulärer und subzellulärer Strukturen für scannende SD-OCT umgesetzt und evaluiert. Im ersten Teil Abschnitt dieses Kapitels werden anhand der in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse die Vor- und Nachteile der dmOCT diskutiert. Zusätzlich erfolgt eine Bewertung der in dieser Arbeit verwendeten dmOCT Auswertungsalgorithmen. Für die dmOCT Messungen wurde die Basler Sprint-Zeilenkamera und die speziell für die OCT konzipierte OctoPlus-Zeilenkamera genutzt, welche sich durch eine besonders hohe Sättigungskapazität auszeichnet. Um eine schnelle volumenbasierte Aufnahme zu ermöglichen, wurde eine für die OCT neue Zeilenkamera (xposure) mit einer 600 kHz Ausleserate eingesetzt. Im zweiten Teil der Diskussion wird die Eignung der xposure-Zeilenkamera für die dmOCT auf Grundlage der Messungen zur Charakterisierung des xposure-Spektrometers erörtert. Der abschließende Teil der Diskussion widmet sich der generellen Eignung der OCT zur zellulären Bildgebung.

5.1 Dynamische OCT

5.1.1 FF-TD-OCT versus mOCT

Um die Machbarkeit der dOCT mit einer abtastenden SD-OCT zu demonstrieren und die Bildqualität zur FF-TD-OCT zu vergleichen, wurde Lebergewebe *ex vivo* gewählt, da es sich aufgrund seiner metabolischen Aktivität und der Größe der Hepatozyten sehr gut für die dmOCT Bildgebung eignet. Obwohl die Hepatozyten mit einer Größe von bis zu 20 μm auch ohne dynamischen OCT-Kontrast von der mOCT und dem FF-TD-OCT aufgelöst werden sollten, konnten die Zellen in beiden Messsystemen nicht dargestellt werden. Dies ist auf den mangelnden Kontrast und das Speckle-Rauschen zurückzuführen. Erst durch die zeitliche Auswertung der dynamischen Signalschwankungen in den OCT-Aufnahmen werden in beiden Systemen gleichermaßen Zellgrenzen, Zytoplasma und Zellkerne in den dmOCT Bildern kontrastreich dargestellt. Rein visuell erscheint die Bildqualität der beiden Systeme vergleichbar. Die Zellkerne erscheinen im FF-TD-OCT System als dunkle Strukturen im Vergleich zum gelbgrünen Zytoplasma, was auch von Thouvenin et. al. beobachtet wurde [144]. Auch in der dmOCT werden die Zellkerne im

Vergleich zum Zytoplasma dunkler aber in einem deutlichen roten Farbton rekonstruiert, was einer hohen Fluktationsfrequenz im Bereich von 5 - 25 Hz entspricht. FF-TD-OCT scheint trotz vergleichbarer NA von 0,3 die gegenüber dem Zytoplasma höhere Dynamik der Zellkerne nicht erfassen zu können [34]. In der Arbeit von Dobrucki et al. wird angenommen, dass nicht nur die Zellkerne eine hohe Rückstreuung aufweisen, sondern auch die Zellkernchen [183]. Interessanterweise werden die Zellkernchen (Nucleoli) innerhalb der Zellkerne in der dmOCT ohne Signalintensität als schwarze Bereiche rekonstruiert, was darauf schließen lässt, dass wenig Rückstreuung vorherrscht. Auch im OCT-Signal ist die Intensität der Zellkernchen deutlich geringer als im Zytoplasma, dem Zellkern und in den Gefäßen. In der FF-TD-OCT werden die Zellkernchen als dunklere Strukturen erst bei einer höheren NA von 0,8 sichtbar [144], was durch den Sensitivitätsvorteil der FD-OCT gegenüber der TD-OCT erklärt werden könnte. Die im Zytoplasma vorhandenen helleren Grüntöne, die eine auffällige ähnliche Verteilung in den dOCT-Aufnahmen von FF-TD-OCT und mOCT aufweisen, könnten einem Zellorganell entsprechen. Hierbei könnte es sich um das raue endoplasmatische Retikulum handeln, da es sich in der Nähe des Zellkerns befindet. Um dies zu bestätigen, wären korrelative Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie geeignet. In den en face Aufnahmen aus unterschiedlichen Tiefen des Lebervolumens zeigt sich aufgrund der hohen NA ein ausgeprägter Defokus. Zellen und subzelluläre Strukturen außerhalb des Fokusbereichs werden dunkler, unschärfer und mit einem geringeren Signal-Rausch-Verhältnis dargestellt.

5.1.2 mOCT mit dynamischen OCT-Kontrast

In dmOCT B-Scans war die Schichtstruktur der Mauszunge bis hin zu einzelnen Zellen der Basalzellschicht sichtbar. Während aufgrund des mangelnden Kontrastes und des Speckle-Rauschens in der OCT-Darstellung maximal drei anatomische Schichten abgrenzbar sind, zeigt die FFT-Auswertung alle vier Schichten in großer Ähnlichkeit zur HE-Färbung, ohne dass die Proben fixiert und angefärbt werden müssen. Durch die native Aufzeichnung von B-Scans können im Vergleich zur FF-TD-OCT wesentlich schneller Tiefeninformationen des Gewebes gewonnen werden. Dies hat den Vorteil, dass Bewegungsartefakte weniger Einfluss auf die Darstellung der Tiefenstrukturen des Gewebes haben.

Das mOCT setzt eine vergleichbar teure Lichtquelle ein, um eine axiale Auflösung von fast einem Mikrometer zu erreichen. Um die Eignung von OCT-Systemen mit günstigen Superkontinuumslichtquellen und dadurch niedrigerer axialer Auflösung für die dmOCT zu untersuchen, wurde am Beispiel des Datensatzes von *ex vivo* Mauszunge der Einfluss der axialen Auflösung durch Anpassung der Breite des Hann-Fensters bei der Rekonstruktion untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bereits eine axiale Auflösung von 7 μm geeignet ist, um einzelne Zellen in der PCA-Auswertung erkennen zu können. In der FFT-Auswertung können die einzelnen Basalzellen erst ab einer axialen Auflösung von 3 μm rekonstruiert werden. Die Basalzellschicht lässt sich in den dOCT-Auswertungen bereits bei einer Auflösung von 25 μm vom umliegenden Gewebe differenzieren. Dadurch könnten auch andere OCT-Systeme mit SLDs oder FDML-Laser für verschiedene Anwendungen der dOCT eingesetzt werden.

Neben der axialen Auflösung ist die Messzeit für die dOCT ein weiterer wichtiger Parameter. Eine kurze Aufnahmezeit für die Bildsequenz ist für *in vivo* Anwendungen und für eine schnelle dOCT-Bildgebung von Vorteil. Eine Beschränkung der FFT auf die ersten B-Scans zeigte, dass dmOCT bereits nach 10 B-Scans bzw. 90 ms verschiedene Schichtstrukturen der Zunge dargestellt kann. Hier konnte die PCA-Auswertung im Vergleich zur STD- und FFT-Auswertung Rauschen effizienter filtern und zelluläre Strukturen bei kürzeren Messzeiten rekonstruiert. Mit zunehmender Anzahl an B-Scans bzw. längerer Messzeit nimmt allerdings der Kontrast zu, bis ab ca. 50 B-Scans eine Sättigung eintritt.

SD-OCT bietet gegenüber TD-OCT den Vorteil, dass auch die Phasen eines A-Scan ohne Beeinträchtigung durch Probenbewegung aufgezeichnet werden. Die Phase reagiert empfindlicher auf axiale Bewegungen als reine Intensitätsmodulationen. Die Information über die Phase lässt genauere Rückschlüsse auf Bewegungen entlang der optischen Achse zu, da sie mit nm-Präzision ausgewertet werden kann. Unter Annahme einer idealen Bewegungskorrektur könnte die Phaseninformationen mehr Bewegungen detektieren, da aber auch das Zeitverhalten der Bewegung eine Rolle spielt ist der Vorteil bisher noch nicht belegt. Da der Rohdatensatz einem hohen Phasenrauschen durch Bewegungen zwischen den B-Scans unterlag, wurde eine phasen-basierte axiale Bewegungskorrektur implementiert und evaluiert. Nach der Bewegungskorrektur konnte anhand der

Auswertung der lokalen Phasenfluktuationen die Basalzellschicht mittels dmOCT dargestellt werden. Dennoch reicht die Bewegungskorrektur nicht aus, um die Störungen der Probenbewegungen auf eine phasen-basierte dmOCT so gut zu kompensieren, dass einzelne Zellen visualisiert werden.

Am Beispiel der dmOCT Zeitserie von Trachea zeigt sich, dass die Verfolgung von Zellen über mehrere Minuten durch dmOCT eine Charakterisierung, Beobachtung und Quantifizierung ihres Verhaltens erlaubt. In einzelnen statischen dmOCT B-Scans sind die Zellen schwer vom umliegenden Gewebe differenzierbar. Erst aus der Bewegung über mehrere Minuten heraus und bei einer geeigneten zeitlichen Abtastung konnten die Immunzellen beobachtet werden. Eine marker-freie Verfolgung von Immunzellen in den Atemwegen wurde mit Multiphotonenmikroskopie durch Nutzung der Autofluoreszenz der Zellen demonstriert [177]. Ein wesentlicher Nachteil ist dabei die für die Fluoreszenz notwendige resonante Anregung höherer Energieniveaus durch hohe Bestrahlungsstärken, welche im zu untersuchenden Gewebe Photoschäden hervorruft. Die dmOCT könnte somit als alternatives Verfahren für die Bildgebung von Immunzellen und zur marker- und schädigungsfreien Untersuchung von Entzündungsprozessen eingesetzt werden. Trotz der Bewegungsempfindlichkeit der dmOCT ist bei *ex vivo* Messungen eine Fixierung des Gewebes über Nadeln ausreichend, um Bildartefakte durch Bewegungen zu vermeiden.

Auswertungsalgorithmen für die dOCT

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Auswertungsalgorithmen für die dmOCT evaluiert: Berechnung der Standardabweichung (STD), Fourier-Transformation (FFT) und Hauptkomponentenanalyse (PCA). Die Berechnung der Standardabweichung der zeitlichen Intensitätsfluktuation der einzelnen Pixel stellt die simpelste Art der Auswertung dar und hat den geringsten Rechenaufwand. Diese Methode wird auch in der OCTA verwendet, um eine Kontrastierung der Blutgefäße zu erzeugen.

Über eine Fourier-Transformation der Intensitätsfluktuationen werden dmOCT-Bilder erzeugt, in denen über die Farbkanäle die Frequenzanteile des dynamischen Zellverhaltens widerspiegeln. Dies bietet gegenüber der Auswertung über die Standardabweichung und der Hauptkomponentenanalyse prinzipiell einen höheren Informationsinhalt, da wie am Beispiel von Zungengewebe unterschiedliche Schichten und subzellulären Strukturen unterschiedliche Fluktuationsfrequenzen aufweisen, in

verschiedenen Farben kodiert werden. Durch die Kontrastierung in Farben können Unterschiede in den dmOCT Bildern leichter wahrgenommen werden. Natürlicherweise bietet sich für die Farbkodierung die mittlere Signalleistung in drei Frequenzkanälen an. Prinzipiell ist eine quantitative Auswertung möglich, allerdings beeinflussen Bewegungen der Probe die Farbgebung, sodass die Reproduzierbarkeit der Farben zwischen mehreren Messungen nicht immer gewährleistet ist. Des Weiteren ist die Einteilung der Frequenzen bei der FFT basierten dmOCT bisher nur empirisch erfolgt und auch abhängig von der Anzahl der aufgezeichneten B-Scans, da diese die spektrale Auflösung bestimmt. Für die hier verwendete Einteilung in Frequenzbänder von 0 - 0,5 Hz, 0,5 - 5 Hz und 5 - 25 Hz variieren die effektiven Frequenzintervalle in Abhängigkeit zur Anzahl der aufgezeichneten B-Scans. Insbesondere kann bei kurzen Sequenzlängen der DC-Anteil nicht sauber vom Grünkanal getrennt werden. Die Analyse des Kontrast-Rausch-Verhältnis für die drei in dieser Arbeit verwendeten Auswertungsalgorithmen zeigte, dass die PCA nicht nur mit wenigen Messdaten überzeugende Ergebnisse liefert, sondern auch zelluläre Details am deutlichsten rekonstruiert. Dennoch erscheinen die dmOCT Bilder in der FFT-Auswertung durch den Farbkontrast in der visuellen Beurteilung am besten. Alternativ zur RGB-Darstellung können auch andere Verfahren zur Transformation der Spektren in Farbbilder gewählt werden. Beispielsweise wurde von J. Scholler die Nutzung des HSV-Farbraums zur Darstellung der dOCT vorgestellt, bei der die Helligkeit des Bildes mit der Intensität der Fluktuation und die Farbe mit der Frequenz verknüpft wurde [184].

Einfluss von Bewegungen

Ein wesentlicher Nachteil der dOCT ist die erforderliche Stabilität während einer Messung, um keine Bildartefakte zu erzeugen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten *ex vivo* Experimente an Leber- und Mauszunge wurde ein von LLTech speziell konzipierter Probenhalter verwendet. Dadurch konnte die notwendige Stabilität gewährleistet werden, um Aufnahmen ohne Bildartefakte aufzuzeichnen. In der Auswertung des Phasenanteils des OCT-Signals konnte trotz der guten Immobilisierung der Proben ein signifikantes Phasenrauschen beobachtet werden, wodurch eine dmOCT-Auswertung auf den Phasenanteil ohne Bewegungskorrektur nicht möglich war. Erst nach Anwendung einer phasenbasierten Bewegungskorrektur der A-Scans konnte die Basalzellschicht

rekonstruiert werden. Dennoch reichte die Registrierung nicht aus, um einzelne Zellen darzustellen. Da die Bewegungskorrektur der Daten mehrere Minuten in Anspruch nimmt, eignet sich diese nicht für eine online Darstellung. In der *in vivo* Bildgebung ist neben Atmung der Blutfluss ein wesentlicher Faktor von Bewegungsartefakten und einer damit einhergehenden Beeinträchtigung der Bildqualität. Beispielsweise werden in OCTA-Aufnahmen durch die starke Fluktuation des Blutflusses tieferliegende Strukturen verdeckt, was als Schatten-Artefakte bezeichnet wird [105]. In den *ex vivo* Messungen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Da der Blutfluss in den *ex vivo* Gewebe nicht mehr aktiv war, konnte deren Einfluss auf das dmOCT-Signal nicht untersucht werden. Abschattungseffekte können prinzipiell auch durch die Fluktuation des Gewebes auftreten. Dies wurde nicht beobachtet, weil die Streuung an den fluktuierenden Strukturen scheinbar nicht stark genug ist. Dennoch könnten die Strukturen, welchen Epithelzellen entsprechen könnten, auch Artefakte durch die Abschattung der Bewegung der Zilien sein. Eine Korrektur von Bewegungen entlang der schnell scannenden Achse oder der optischen Achse bei der Aufnahme von B-Scans für die dmOCT kann in der scannenden SD-OCT bis zu einem gewissen Grad vorgenommen werden. Eine Verschiebung der Probe orthogonal zur schnell scannenden Achse führt unweigerlich zu einem Verlust von Informationen für die dmOCT. Eine Registrierung von Bewegungen über einen größeren Zeitraum wäre nur durch die Aufnahme kompletter Volumen umsetzbar. Generell gilt, dass eine schnelle Volumenaufnahme für eine Bewegungskorrektur von Vorteil ist. Im Bereich der OCT wurden bisher jedoch nur wenige Verfahren zur Bewegungskorrektur für Volumen veröffentlicht [185, 186]. Insbesondere für mögliche *in vivo* Anwendungen, bei denen keine Fixierung ohne weiteres möglich ist und somit Bewegungsartefakten durch Blutfluss oder Atmung ausgesetzt sind, könnten A-Scan-Raten im MHz Bereich und damit verbundenen Abtastung ganzer Volumen für eine Bewegungskorrektur von Vorteil sein. OCT-Systeme mit A-Scan-Raten im MHz-Bereich erreichen derzeit nur eine axiale Auflösung von 5 μm und sind damit nur bedingt geeignet zelluläre oder subzelluläre Strukturen mit einer ausreichenden Bildqualität darzustellen [187].

Bisher schränken die Anforderungen an die dOCT wie Stabilität der Probe während einer Messung und die notwendige Messzeit die Anwendbarkeit für *in vivo* Anwendungen ein.

Dennoch konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, dass sich bei starker Fixierung der Probe sich auch *in vivo* zelluläre und subzelluläre Strukturen rekonstruieren lassen [168, 188]. Beispielsweise wurde von Scholler Leber *in vivo* mit dOCT untersucht, wobei trotz Fixierung die Bildqualität aufgrund von Atmung und Herzschlag nicht ausreichend war, um zelluläre oder subzelluläre Strukturen darzustellen [168]. Zudem wurde in der Arbeit von Hui Min et al. Epithelgewebe menschlicher Haut *in vivo* visualisiert. Dabei konnten Epithelzellen mittels dOCT dargestellt werden [188].

5.1.3 Vergleich der Spektrometer

Da Bewegungsartefakte eine Limitierung der dOCT ist, wurde untersucht, ob mit eine neu erhältlichen 600 kHz Kamera für diese Anwendung besser geeignet ist. Die bisher eingesetzte OctoPlus-Zeilenkamera wurde speziell für die Anwendung in der OCT entwickelt und wird in kommerziellen OCT-System genutzt. Sie erreicht eine maximale Ausleserate von bis zu 250 kHz bei einer Sättigungskapazität von 250.000 e⁻. Die hohe Sättigungskapazität der OctoPlus Zeilenkamera wird durch die vergleichsweise große Fläche der einzelnen Pixel von 10 x 200 µm erreicht. Die neue xposure-Zeilenkamera wurde für industrielle Anwendungen, bei denen hohe Geschwindigkeiten erwünscht sind, konzipiert. Sie erreicht eine maximale Ausleserate von 600 kHz, allerdings beträgt die Sättigungskapazität nur 13.000 e⁻. Da eine geringere Sättigungskapazität zu einer schlechteren Qualität der OCT-Bilder führen kann und die Kamera bisher noch nicht für die OCT eingesetzt wurde, vergleicht diese Arbeit wichtige Bildgebungsparameter wie axiale Auflösung, Roll-Off und Sensitivität, welche mit den beiden Zeilenkameras erzielt werden können. Die mit den beiden Zeilenkamera betriebenen Spektrometer wurden mit einem Gitter für einen Wellenlängenbereich von 550 nm bis 950 nm ausgelegt. Daher sind die entscheidenden Unterschiede die Kameraparameter Ausleserate und Sättigungskapazität.

Die axiale Auflösung ist bei beiden Spektrometern wurde mit 1,8 µm und 1,9 µm nahezu äquivalent und weicht nur um wenige hundert Nanometer von der theoretisch erreichbaren axialen Auflösung bei einer Hann-Fensterung ab. Die laterale Auflösung des mOCT-Aufbaus wurde mit dem verwendeten Objektiv mit einer NA von 0,3 auf 1,3 µm bestimmt und ist damit nur 0,37 µm schlechter als die theoretisch erreichbare laterale Auflösung bei konfokaler Bildgebung.

Der Roll-Off beträgt beim OctoPlus-Spektrometer 9 dB und beim xposure-Spektrometer 12 dB. Der Unterschied im Roll-Off ist auf Übersprechen zwischen den Pixeln und Aberrationen des Spektrometers zurückzuführen, was zu einer schnelleren Unterabtastung des Signals führt und sich zugleich in einem Signalverlust in größeren Messtiefen bemerkbar macht.

Die Sensitivität des OctoPlus-Spektrometers ist im Durchschnitt bei allen A-Scan-Raten gegenüber dem xposure-Spektrometer um 11,3 dB höher. Bei maximaler A-Scan-Rate von 600 kHz erreicht das mOCT mit dem xposure-Spektrometer eine nur ca. 6 dB geringere Sensitivität gegenüber dem OctoPlus-Spektrometer bei 248 kHz. Die Berechnung der Sensitivität wurden unter Annahme eines Duty Cycle von 1 für die Belichtungszeit bei der jeweiligen A-Scan-Rate berechnet. Die Belichtungszeit für die jeweiligen A-Scan-Raten konnten nur in der xposure-Zeilenkamera eingestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass nur $\frac{2}{3}$ des Kehrwertes der A-Scan-Rate für die Belichtung genutzt werden können, wodurch die theoretische Sensitivität im Durchschnitt um 3 dB abnehmen würde. Der theoretisch erreichbare Dynamikbereich lässt sich nach Gleichung 2.44 für das OctoPlus- und xposure-Spektrometer mit 74 dB, bzw. 62 dB abschätzen. Der in einer Messtiefe von 100 μm bestimmte experimentelle Dynamikbereich beträgt für die OctoPlus-Spektrometer 48 dB und für das xposure-Spektrometer 52 dB. Der Dynamikbereich des OctoPlus-Spektrometers ist aufgrund des hohen Untergrundrauschen um 4 dB schlechter, da dieses mit der Bestrahlungsstärke zunimmt. Der in beiden Spektrometern experimentell bestimmte schlechtere Dynamikbereich ist auf das zusätzliche spektrale Rauschen der Superkontinuum-Lichtquelle zurückzuführen [189].

Um die spektrale Bandbreite der Spektrometer von 550 nm bis 950 nm abzudecken und damit eine hohe axiale Auflösung im Bereich von 1 - 2 μm in der OCT zu ermöglichen wurde eine Superkontinuum-Lichtquelle verwendet. Die Superkontinuum-Lichtquelle erzeugt einen zusätzlichen Rausch-Untergrund, der mit der Tiefe abnimmt [63, 64]. Jeder Puls variiert leicht in seiner spektralen Intensitätsverteilung. Während einer Belichtungszeit der Zeilenkamera wird das Spektrum gemittelt, wodurch sich die Schwankungen, die sich als zusätzliches Rauschen äußern, teilweise kompensiert werden. Mit steigender Ausleserate und damit einhergehender kürzeren Belichtungszeit wird über weniger Pulse gemittelt, sodass das SNR abnimmt. Um dem entgegenzuwirken könnten

alternativ Superkontinuum-Lichtquellen eingesetzt werden, welche über Faser basiertes Puffern mehr Lichtpulse zum Mitteln während der Belichtungszeit der Kamera erzeugen und somit das Rauschen zu reduzieren [190]. Das xposure-Spektrometer ermöglicht auf Kosten einer 6 dB geringeren Sensitivität eine ca. um einen Faktor 2 schnellere Bildgebung. Für die Untersuchung komplexer Vorgänge des Zilientransport ist ein größeres FOV durch eine schnellere Abtastung von Vorteil, da sich die komplexen Vorgänge des Schleimtransports besser untersuchen lassen. Dennoch zeigt sich, dass die geringere Sensitivität der xposure-Zeilenkamera nachteilig für die Bildqualität ist. Die schlechtere Sensitivität des xposure-Spektrometer zeigte sich beispielsweise in einem höheren Rauschen im Vergleich der beiden dmOCT Volumenaufnahmen von Leber *ex vivo*. Durch eine Anpassung der xposure-Software an die OctoPlus-Zeilenkamera könnten die softwareseitigen Limitierungen des OctoPlus-Spektrometers in ThorImage aufgehoben werden, sodass eine schnelle volumetrische Bildgebung bei kleineren FOV möglich wäre. Um die Vorteile der hohen Sensitivität mit einer höheren Bildgebungsgeschwindigkeit zu kombinieren, könnten auch mehrere OctoPlus-Spektrometer synchron für die Detektion eingesetzt werden. Die Arbeitsgruppe um D. Miller konnte in einer Arbeit durch die Synchronisierung mehrerer Zeilenkameras eine A-Scan-Rate von 1 MHz bei einer axialen Auflösung auf 5,3 μm ($n=1,3$) erreichen und Photorezeptoren auf der Retina *in vivo* darstellen [191].

5.1.4 mOCT und dmOCT mit 600 kHz A-Scan-Rate

Aufgrund der begrenzten Messgeschwindigkeit bei hochauflösendem scannenden SD-OCT konnte Zilientransport bisher nur mit B-Scans aufgezeichnet werden [19, 112, 124]. Die Bewegung der Zilien und Partikel konnte somit nur zweidimensional ausgewertet werden, weshalb komplexe Transportmechanismen nicht komplett erfasst werden konnten. Durch den Einsatz des xposure-Spektrometers mit einer A-Scan-Rate von 600 kHz und einer eigens dafür entwickelten Ansteuerungssoftware konnte in dieser Arbeit eine hochaufgelöste 4D OCT-Aufnahme umgesetzt werden. In den 4D Aufnahmen konnten einzelne Zilienbüschel über die Zeit visualisiert werden. Die Volumendarstellung erlaubt zudem die Visualisierung des Partikeltransports und des Epithelgewebes mit einzelnen Epithelzellen bei einer NA von 0,3. Dies kann die Zuordnung von Zilien zu einzelnen Epithelzellen ermöglichen. Das hier vorgestellte Modellsystem für den

Flimmertransport stellt die *in vivo* Situation dennoch nur unvollständig dar. Statt nur einer Auflage mit einer dünnen Mucusschicht ist das Gewebe vollständig in Flüssigkeit eingebettet und Luftströmung, Husten bzw. Atmung können als Einflussfaktoren nicht untersucht werden. Jedoch zeigt bereits dieses vereinfachte Modell die Notwendigkeit von hoher Auflösung, Geschwindigkeit und dreidimensionaler bzw. vierdimensionaler Bildgebung für das Studium von Transportvorgängen in den Atemwegen.

Bidirektionales Scannen erforderte eine nachträgliche Prozessierung, um Verschiebungen des bidirektionalen Scanmusters von räumlich benachbarten B-Scans zu kompensieren. Durch den besseren Kontrast in der dmOCT Aufnahme konnten die Scanartefakte in der dmOCT Lebermessung durch einen Deinterlacing-Algorithmus korrigiert werden. Alternativ könnte die Verschiebung der benachbarten A-Scans mit einer bekannten Probe eingemessen werden und dann zur Korrektur der Messungen verwendet werden. Voraussetzung ist eine ausreichende zeitliche Stabilität der Scannerartefakte. Zusätzlich traten Artefakte dabei vor allem zu Beginn bei der Beschleunigen des galvanometrische Scanners und am Ende beim Umkehrpunkt auf, weswegen bis zu 30 % der Ränder eines OCT Volumens Artefakt behaftet sind. Bei höheren A-Scan-Raten könnten alternativ zu galvanometrischen Scannern resonante Scanner eingesetzt werden. Diese arbeiten bei einer festen Frequenz und sind daher weniger flexibel, ermöglichen jedoch höhere B-Scan-Raten gegenüber galvanometrischen Scannern [192]. Darüber hinaus wäre auch der Einsatz von Lissajous-Figuren für das Scanmuster möglich, um die Resonanzfrequenz der galvanometrischen Scanner optimal auszunutzen [186]. Ein Nachteil von Lassajours-Figuren ist die räumlich nicht äquidistante Abtastung in der xy-Ebene.

5.2 OCT zur zellulären Bildgebung

Wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, wurde hochauflösende OCT bisher hauptsächlich für spezifische Anwendungen an der Retina bis 2008, der Atemwege und zur Erkennung von Plattenepithelkarzinomen eingesetzt [20]. Zur Untersuchung zellulärer Prozesse und Dynamiken werden üblicherweise Konfokal- und Fluoreszenzmikroskopie genutzt, die eine axiale und laterale Auflösung von bis zu 600 bzw. 200 nm ermöglichen [193, 194]. Auf Fluoreszenz basierte Techniken bieten die Möglichkeit zur Darstellung eines spezifischen Kontrastes durch Einbringung von fluoreszierenden Proteinen [195].

Mikroskopietechniken wie Phasenkontrastmikroskopie, die für dünne, optisch transparente Zellkulturen gut funktionieren, sind für die Abbildung von 3D-Zellkulturen aufgrund fehlender Tiefenauflösung weniger geeignet [196].

Dreidimensionale Zell- und Organkulturen werden immer wichtigere Werkzeuge in der biomedizinischen Forschung, da sie dem natürlichen Gewebe ähnlicher sind. Zu den Techniken, die biologische Proben mit hoher Auflösung abbilden können, gehören die konfokale Mikroskopie, die Multiphotonenmikroskopie und die optische Kohärenztomografie [197]. Bisher wird die OCT aufgrund des schlechten Kontrastes kaum als Mikroskopieverfahren eingesetzt. Die für zelluläre und subzelluläre Bildgebung notwendige Auflösung kann in der OCT nur mit teuren und aufwendigen Lichtquellen realisiert werden, da die Erzeugung eines sehr breitbandigen Spektrums notwendig ist. Generell konnte in den letzten Jahren die A-Scan-Rate der OCT um mehrere Größenordnungen gesteigert werden [198], wohingegen die axiale Auflösung nur knapp um eine Größenordnung verbessert wurde. Aufgrund der begrenzten Bandbreite der optischen Halbleiterverstärker, die in Lichtquellen für die SS-OCT verwendet werden, ist die axiale Auflösung von SS-OCT Systemen bisher auf über 5 μm begrenzt (Kolb et al.) [187].

Abbildung 41 stellt die Voxel-Rate verschiedener in der Literatur beschriebener OCT-Aufbauten in Abhängigkeit von der axialen Auflösung dar. Unterschieden wird zwischen dem Prinzip - TD-OCT (blau), SD-OCT (orange) und SS-OCT (grün) - und der Parallelisierung der Detektion. Scanning (flying spot) OCT ist als Kreis, LF-OCT als Strich und FF-OCT als Quadrat dargestellt. Um die Geschwindigkeiten der Systeme zu vergleichen, wurden die in den Veröffentlichungen angegebenen Geschwindigkeiten auf eine Voxelrate umgerechnet. Die in dieser Arbeit verwendete xposure-Zeilenkamera ist mit 600.000 A-Scans/s bzw. 600 MVoxel/s die schnellste Zeilenkamera die bisher in der SD-OCT (diese Arbeit) eingesetzt wurde [170]. Eine von der Arbeitsgruppe um K. Bizheva eingesetzte Kamera für OCT mit hoher axialer Auflösung wurde bei einer Ausleserate von 400 kHz getestet [199].

Andere hochauflösende SD-OCT-Systeme im Bereich zwischen 1 - 2 μm erreichen typischerweise A-Scan-Raten im Bereich von 20 bis 250 kHz (Liu et al., Leung et al., Tan, Marchand et al., Wojtkowski et al.) [71, 112, 113, 152, 200]. Die in der OCT häufig

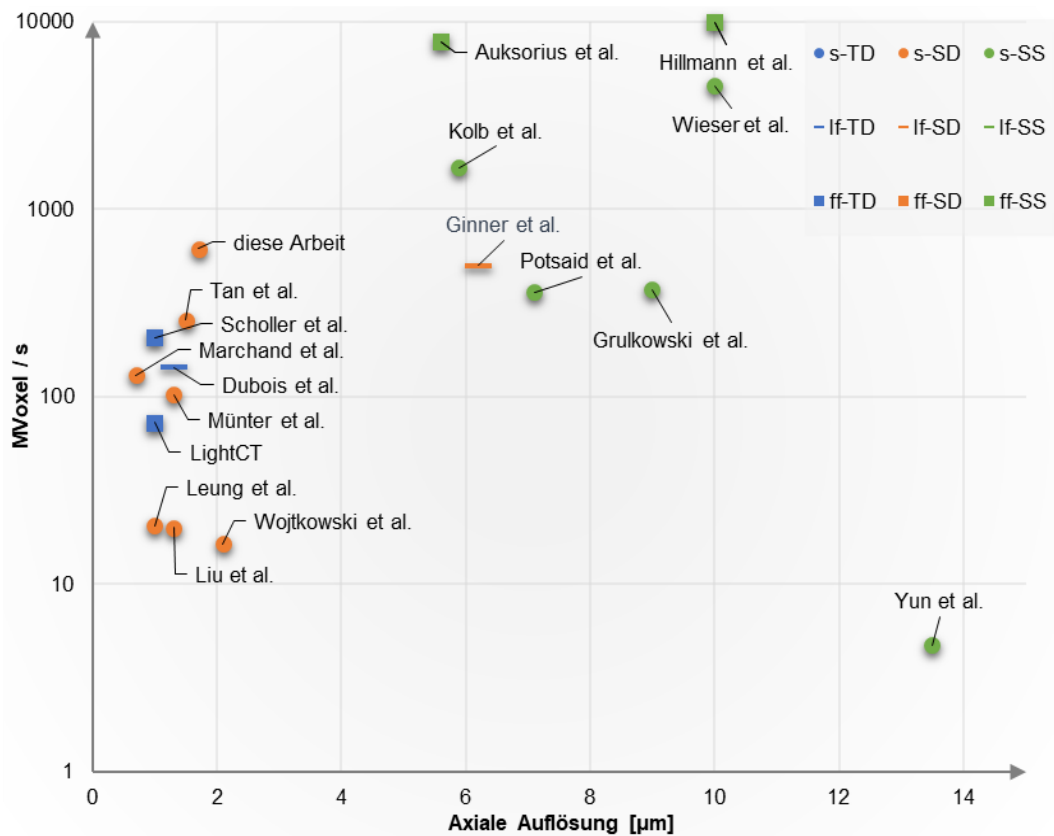


Abbildung 41: Voxelrate und Auflösung verschiedener OCT-Systeme - S: Scanning (●); LF: Line Field (-); FF: Full Field (■); TD: Time Domain (blau); SD: Spectral Domain (orange); SS: Swept Source (grün). SS-OCT-Systeme erreichen A-Scan-Raten im MHz Bereich bei axialen Auflösungen von bis zu 5-6 µm. Um hohe axiale Auflösungen von bis zu 1-2 µm zu erreichen, werden breitbandige Lichtquellen benötigt, die in der TD- und SD-OCT verfügbar sind.

verwendete Basler Sprint-Zeilenkamera erreicht eine Voxelrate von 127 kVoxel/s bei einer Auflösung von 1,3 µm (Münter et al.) [171]. Mittels einer Streak-Kamera [201] oder durch Parallelschaltung hunderter Photodioden als Alternative zu einer Zeilenkamera [202] wurden in der scanning SD-OCT auch A-Scan-Raten im Megahertz Bereich erreicht. Aufgrund des hohen technischen Aufwands sind diese jedoch nur bedingt für den klinischen Alltag geeignet. Durch Multiplexing von vier Spektrometern konnte auch eine A-Scan-Rate von 1 MHz realisiert werden [191]. Die Triggerung des Systems ist dabei deutlich aufwendiger und die optischen Komponenten zur Strahlteilung begrenzten die axiale Auflösung auf 5,3 µm.

Ein in der Arbeitsgruppe um R. Leitgeb entwickelter Hochgeschwindigkeits-LF-SD-OCT Aufbau erreichte eine B-Scan-Rate von 2,5 kHz bei einer axialen Auflösung um die 6 µm (Ginner et al.) [203]. Durch die hohe Geschwindigkeit und Phasenstabilität konnte eine

numerische Refokussierung *in vivo* durchgeführt werden. Aufgrund des Sensitivitätsvorteils und der höheren Geschwindigkeit von FD-OCT Systemen in der scannenden OCT wird die TD-OCT mittlerweile hauptsächlich als LF-OCT oder FF-OCT Variante umgesetzt. Mittels eines LF-TD-OCT Systems konnte durch die parallele Akquisition eines B-Scans eine A-Scan-Rate von bis zu 70 kHz erreicht werden (Dubois et al.) [120]. Das System hat eine axiale Auflösung von 1,1 μm und eine laterale Auflösung von 1,3 μm . Durch die Akquisition von en face Ebenen durch eine Flächenkamera konnten in der FF-TD-OCT Geschwindigkeiten von bis zu 207 kVoxel /s bei 100 en face Bildern/s erreicht werden (Scholler et al.) [184]. Zu den bisher schnellsten Varianten in der OCT gehören SS-OCT Systeme [204]. Swept-Source basierte Ansätze zur OCT erreichen Geschwindigkeiten im Gvoxel-Bereich (Grulkowski et al., Yun et al., Potsaid et al.) [205-207]. Die bisher schnellsten scanning SS-OCT System mit FDML Lasern erreichen A-Scan-Raten im Bereich von 6 MHz bei einer Volumenrate von 40 V/s (Wieser et al.) [208]. In Kombination mit einer Hochgeschwindigkeitskamera können in der FF-SS-OCT Volumen innerhalb weniger Millisekunden aufgezeichnet, wobei die bisher schnellsten A-Scan-Raten im MHz Bereich, bzw. Voxel-Raten im GHz-Bereich erreicht wurden (Aukorius et al., Hillmann et al.) [93, 209].

Es zeigt sich, dass nur SD-OCT, LF-TD-OCT und FF-TD-OCT Systeme aufgrund der erreichbaren axialen Auflösung im Bereich von 1 μm für dOCT mit zellulärer Auflösung geeignet sind. Dennoch bestehen zwischen FF-TD-OCT und scanning SD-OCT (mOCT) wesentliche Unterschiede, die im Folgenden näher erläutert werden. In der scanning SD-OCT werden nativ Tiefenschnittbilder generiert, wohingegen in der FF-TD-OCT en face Bilder akquiriert werden. Tiefeninformationen können in der FF-TD-OCT durch Verfahren des Interferometers oder der Probe gewonnen werden. Scannende Systeme sind flexibler bei der Wahl des Bildfeldes, was für bestimmte Anwendungen von Vorteil ist. In der FF-TD-OCT wird das Rohsignal an der Kamera für die Auswertung genutzt. Das dOCT-Bild wird anschließend durch die Verrechnung der Rohdaten erzeugt. In der scanning SD-OCT muss dagegen zuerst eine numerische Rekonstruktion der A-Scans stattfinden, was zu einer erhöhten Rechenzeit führt und eine Echtzeitdarstellung von dOCT-Bildern in der SD-OCT erschwert. Trotz der unterschiedlichen Art der Bildakquisition sind die Ergebnisse wie am Beispiel von *ex vivo* Leber gezeigt vergleichbar und es kann eine ähnliche

Bildqualität erreicht werden. In der FF-TD-OCT müssen zur Aufzeichnung der Phaseninformation zusätzlich zum Betrag des rückgestreuten Lichtes mehrere interferometrische Bilder mit verschiedenen Phasen der Referenzstrahlung aufgezeichnet und anschließend verrechnet werden [210]. Die Phase steht dann für eine en face Ebene zur Verfügung, da FD-OCT im Vergleich zu TD-OCT gleichzeitig zum Betrag des zurückgestreuten Lichts auch die Phaseninformationen enthält, könnten unter der Bedingung eines phasenstabilen Aufbaus zusätzliche Informationen wesentlich schneller gewonnen werden. In der FF-TD-OCT müssen zur Bestimmung der Phase mehrere OCT-Bilder aufgenommen und miteinander verrechnet werden. Beispielsweise könnte somit in der SD-OCT eine quantitative Auswertung der dynamischen Vorgänge mit nm-Präzision erfasst oder eine numerische Refokussierung ermöglicht werden [211].

6 Zusammenfassung

Die optische Kohärenztomografie ist ein bildgebendes Verfahren, welches mit hoher Auflösung im Mikrometerbereich zelluläre und subzelluläre Strukturen in Gewebe darstellen kann. Der Kontrast basiert dabei auf der Rückstreuung von Licht an optisch inhomogenen Gewebestrukturen. Ein wesentlicher Nachteil der OCT ist das durch die kohärente Bildgebung auftretende Speckle-Phänomen, welches den Kontrast und die Bildqualität reduziert. Mit der erstmals an einem FF-TD-OCT Aufbau demonstrierten dOCT konnte aufgezeigt werden, dass intrinsische Zellbewegungen dazu genutzt werden können, um einen besseren Kontrast in den OCT-Bildern zu erzeugen. Durch die Einteilung der Bewegung anhand von Frequenzbereichen in unterschiedliche Farbkanäle wurden ‚Farb-‘ OCT-Bilder erzeugt. Dabei wurden im Wesentlichen zwischen langsamen, mittleren und schnellen Bewegungen differenziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde evaluiert, ob und inwieweit sich die dOCT auf hochauflösende scanning SD-OCT (mOCT) übertragen lässt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus hoher Auflösung und hoher Geschwindigkeit in der scanning SD-OCT Zellen mit dynamischen OCT-Kontrast darstellen kann. Durch die Auswertung der Signalfluktuation von OCT-Aufnahmen konnte eine Kontraststeigerung erreicht werden, welche die Visualisierung von zellulären und subzellulären Strukturen erlaubte. Somit konnten zelluläre Strukturen im Querschnittsbild dargestellt werden. Dynamische mOCT-Aufnahmen wurden an drei unterschiedlichen Organen einer Maus durchgeführt, die sich hinsichtlich Zellgröße und Gewebeaufbau unterscheiden. Mit Lebergewebe konnte gezeigt werden, dass eine ähnlich gute Bildqualität wie in der FF-TD-OCT mit dynamischen OCT-Kontrast erreicht werden konnte. Ein wesentlicher Vorteil der Implementierung von dOCT für scannende FD-OCT ist die Möglichkeit zur schnellen direkten Aufnahme von Tiefschnittbildern mit variablen Bildfeldern. An Zunge und Trachea konnten die typischen Schichtstrukturen visualisiert werden. Zellbewegungen von Immunzellen konnten in dmOCT-B-Scans über die Zeit visualisiert werden.

Weiter wurden für die mOCT angepasste Algorithmen Standardabweichung, Hauptkomponentenanalyse und Fourier-Transformation zur dmOCT entwickelt und miteinander verglichen. Das beste Kontrast-Rausch-Verhältnisses wurde mit der

Hauptkomponentenanalyse erreicht, da sie das Rauschen in der dmOCT effizient minimiert. Allerdings fehlen die gewebespezifische Informationen, welche die Frequenzanalyse bietet.

Zur Erhöhung der Messgeschwindigkeit der mOCT und dmOCT wurde eine neue Zeilenkamera evaluiert, die bisher für die OCT noch nicht eingesetzt wurde. Die Kamera wurde mit der bisher eingesetzten Zeilenkamera verglichen, welche aufgrund ihrer wesentlich höheren Sättigungskapazität und höheren Quanteneffizienz prinzipiell eine bessere Bildqualität bietet. Mit einer circa zweimal schnelleren A-Scan-Rate konnte durch die eigens entwickelte Steuersoftware eine wesentlich schnellere Aufnahme von OCT- und dmOCT Volumen umgesetzt werden. Hierbei konnte die Aufnahmezeit für ein dmOCT Volumen von ca. 15 Minuten auf 41,6 Sekunden reduziert werden. Aufnahmen von dmOCT Volumen ohne besondere Immobilisierung der Probe wurden demonstriert.

7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass auch in der scannenden mikroskopischen OCT Zellen und subzelluläre Strukturen mit sehr guten Kontrast dargestellt werden können. Für die hochauflösende OCT ergeben sich durch diese Methode daher neue Anwendungsfelder und Anforderungen, die im Folgendem erläutert werden.

Um die bestmögliche Bildqualität in der dmOCT zu erreichen, bieten sich hochauflösende OCT-Systeme an. Als Alternative zu Superkontinuumlichtquellen wäre auch der Einsatz von Titan:Saphir-Laser möglich oder mehrere kombinierte LEDs bei verschiedenen Zentralwellenlängen, welche das Spektrum erweitern. Um höhere Geschwindigkeiten zur Detektion von Bewegungen während einer dmOCT Aufnahme zu erreichen, könnten in Zukunft auch FF-SS-OCT Aufbauten in Kombination mit einer hohen Auflösung eingesetzt werden. Durch die Weiterentwicklung von Swept Source Lasersystemen für eine axiale Auflösung von 1 - 2 μm wäre eine *in vivo* dmOCT Volumen-Bildgebung möglich. Die Aufnahme von mehreren Volumen pro Sekunde könnte somit eine 3D-Bewegungskorrektur für *in vivo* Anwendungen ermöglichen. Im Bereich von SD-OCT Systemen wäre zusätzlich auch der Einsatz mehrerer Zeilenkameras an einem OCT-Aufbau möglich, welche durch eine zeitliche Triggerung synchronisiert werden, um die Messgeschwindigkeit signifikant zu steigern.

Ein Hindernis für *in vivo* Anwendung ist die für dmOCT erforderliche Stabilität während einer Messung. Die nicht-gleichförmige diskrete Fourier-Transformation (engl. non-uniform fast Fourier transformation, NUFFT) ermöglicht eine Fourier-Transformation auf nicht-äquidistant abgetasteten Daten [212, 213]. Bewegungsartefakte könnten durch die zeitlich nicht-äquidistante Abtastung während einer dmOCT Aufnahme vor einer Prozessierung entfernt werden. Da in der dmOCT im Vergleich zur OCT-Prozessierung durch die zusätzliche Fourier-Transformation und der größeren Datenmenge höherer Rechenaufwand notwendig ist, könnten Grafikkarten für eine parallelisierte Auswertung eingesetzt werden. Grafikkarten basierte OCT Prozessierung wird bereits für MHz OCT Systeme für eine online Darstellung der OCT Daten eingesetzt [214]. Um die Speichergröße der Datensätze während der dmOCT zu reduzieren, könnten auch Sparse-Sampling Ansätze genutzt werden [215].

Die in dieser Arbeit aufgenommenen dmOCT Volumen weisen einen Defokus außerhalb der Fokusregion auf. FD-OCT bietet aufgrund der kohärenten Bildgebung die Möglichkeit Strukturen außerhalb der Fokusregion in einem Nachbearbeitungsschritt numerisch zu refokussieren [93, 216]. Eine Kombination der dmOCT mit nachträglicher Refokussierung würde die zelluläre Darstellung über einen größeren Schärfebereich in der scanning FD-OCT ermöglichen. Die Refokussierung von OCT-Daten kann auf Basis unterschiedlicher Ansätze durchgeführt werden. Neben der Korrelation von Subaperturen und Bildmetriken können auch Leitstern-Methoden verwendet werden [216]. Der durch die dOCT erzeugte Kontrast bietet die Möglichkeit zellulärer Strukturen als Metrik bei der Optimierung zur Refokussierung zu nutzen. Ähnlich der Leitstern-Methode, bei der beispielsweise in der OCT Photorezeptoren als Punktstreuer zur Messung der PSF genutzt werden, könnten durch die dmOCT beispielsweise Zellkerne als Metrik bei der Optimierung für die Refokussierung der einzelnen kohärenten Volumen eingesetzt werden. Alternativ dazu könnte eine Fokusverlängerung auch durch den Einsatz von Bessel-Strahlen erfolgen [217].

Um die Signalentstehung zur dOCT besser zu verstehen, wäre die Anbindung eines 2-Photonen-Mikroskops oder eines Fluoreszenzmikroskops an das mOCT von großen Vorteil. Besonders in den Leberdaten zeigten sich im direkten Vergleich zwischen mOCT und FF-TD-OCT Strukturen, die ähnliche dOCT Signale erzeugen, deren Ursprung aber noch nicht verifiziert werden konnte. Um die biologischen Ursachen besser eingrenzen zu können, wäre eine Kreuzvalidierung mit einer anderen Bildgebungsmodalität notwendig. Die Signalentstehung zur dOCT könnte in einem ersten Schritt an einzelnen Zellen wie Hepatozyten oder Sphäroiden untersucht werden. Das Verständnis der Signalentstehung könnte auch helfen, anhand der Signale eine automatisierte Zelltypisierung durchzuführen. Durch die Implementierung von KI-Ansätzen zur automatischen Klassifizierung der dmOCT Daten könnte eine schnelle Segmentierung einzelnen Zellen anhand ihrer spezifischen Signale umgesetzt werden. Die Segmentierung und Analyse der Signale in den dmOCT durch KI könnte damit auch die Differenzierung von malignen und benignen Gewebeänderungen ermöglichen. Die Erforschung der Wechselwirkung von Zellen in komplexeren Gewebetypen könnten in einem weiteren Schritt beispielsweise auch an Lab-on-a-Chip und Organ-on-a-Chip System erfolgen. Dies bezeichnet ein

mikrofluidisches System zur Nachbildung von Funktionalitäten von Organen. Durch den Einsatz von Organmodellen oder einzelnen Sphäroiden könnte somit auch auf Tierversuche verzichtet werden und die Grundlagenforschung zur dOCT vereinfachen. In der Anwendung könnte dmOCT zur Untersuchung der Dynamik von Krebszellen und der Tumor-Angiogenese, welche aktiver Gegenstand in der Forschung sind, genutzt werden [218, 219]. Eine Möglichkeit der zukünftigen Anwendung der dmOCT besteht auch in der Parametererhebung des untersuchten Gewebes wie Zelldichte, Metabolismus und Struktur. DmOCT bietet beispielsweise die Möglichkeit das Volumenverhältnis von Zelle zu Zellkern zu bestimmen (Kern-Plasma-Relation), welches als wichtiger Indikator zur Beurteilung der Gewebsatypie gilt. Eine erhöhte Kern-Plasma-Relation wird häufig sowohl mit präkanzerösen Dysplasien als auch mit bösartigen Zellen in Verbindung gebracht. Interne Kernstrukturen können ebenfalls wichtige Marker für die pathologische Diagnose sein. So sind beispielsweise große Nukleoli und verklumptes Chromatin charakteristisch für Anaplasie [220]. Zudem wären Entzündungsreaktionen als weiteres Anwendungsgebiet zu nennen. Mittels dmOCT könnten zudem auch spezifische Zellreaktionen auf externe Reize untersucht werden.

Ein weiterer interessante Anwendung für die optische Biopsie *in vivo* ermöglicht auch die OCT mittels Endoskopie-Ansatz [16, 17, 221-223]. Hiermit könnten anstatt der bisherigen Biopsie und aufwendiger Aufarbeitung der Probe für die pathologische Befundung eine Bildgebung des Zellgewebes im Körper über eine Sonde ermöglicht werden. Darüber hinaus wäre auch eine intraoperative Lösung mittels endoskopischen Ansatz möglich [9].

Literaturverzeichnis

1. D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, und J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography," *Science* **254** (1991). 10.1126/science.1957169
2. J. W. Goodman, *Statistical optics*, 2 (John Wiley & Sons, 2015).
3. J. M. Schmitt, S. H. Xiang, und K. M. Yung, "Speckle in optical coherence tomography," *Journal of Biomedical Optics* **4** (1999). 10.1117/1.429925
4. V. B. Silva, D. Andrade De Jesus, S. Klein, T. van Walsum, J. Cardoso, L. S. Brea, und P. G. Vaz, "Signal-carrying speckle in optical coherence tomography: a methodological review on biomedical applications," *Journal of Biomedical Optics* **27** (2022). 10.1117/1.JBO.27.3.030901
5. G. R. Ge, J. P. Rolland, und K. J. Parker, "Speckle statistics of biological tissues in optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* **12** (2021). 10.1364/BOE.422765
6. E. A. Swanson, J. A. Izatt, M. R. Hee, D. Huang, C. P. Lin, J. S. Schuman, C. A. Puliafito, und J. G. Fujimoto, "In vivo retinal imaging by optical coherence tomography," *Opt. Lett.* **18** (1993). 10.1364/OL.18.001864
7. A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, W. Drexler, G. Kamp, und H. Sattmann, "In vivo optical coherence tomography," *American Journal of Ophthalmology* **116** (1993). 10.1016/S0002-9394(14)71762-3
8. J. Fujimoto, und E. Swanson, "The development, commercialization, and impact of optical coherence tomography," *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **57** (2016). 10.1167/iovs.16-19963
9. O. M. Carrasco-Zevallos, C. Viehland, B. Keller, M. Draelos, A. N. Kuo, C. A. Toth, und J. A. Izatt, "Review of intraoperative optical coherence tomography: technology and applications [Invited]," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.001607
10. J. Olsen, J. Holmes, und G. B. Jemec, "Advances in optical coherence tomography in dermatology-a review," *Journal of Biomedical Optics* **23** (2018). 10.1117/1.JBO.23.4.040901
11. T. Yonetsu, B. E. Bouma, K. Kato, J. G. Fujimoto, und I. K. Jang, "Optical coherence tomography - 15 years in cardiology," *Circulation Journal* **77** (2013). 10.1253/circj.cj-13-0643.1

12. E. Sattler, R. Kästle, und J. Welzel, "Optical coherence tomography in dermatology," *Journal of Biomedical Optics* **18** (2013). 10.1117/1.JBO.18.6.061224
13. L. P. Hariri, M. Mino-Kenudson, E. J. Mark, und M. J. Suter, "In vivo optical coherence tomography: the role of the pathologist," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **136** (2012). 10.5858/arpa.2012-0252-SA
14. J. G. Fujimoto, M. E. Brezinski, G. J. Tearney, S. A. Boppart, B. Bouma, M. R. Hee, J. F. Southern, und E. A. Swanson, "Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography," *Nature Medicine* **1** (1995). 10.1038/nm0995-970
15. W. Jung, und S. A. Boppart, "Modern trends in imaging V: optical coherence tomography for rapid tissue screening and directed histological sectioning," *Analytical Cellular Pathology* **35** (2012). 10.3233/ACP-2011-0047
16. J. G. Fujimoto, C. Pitris, S. A. Boppart, und M. E. Brezinski, "Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy," *Neoplasia* **2** (2000). 10.1038/sj.neo.7900071
17. G. J. Tearney, M. E. Brezinski, B. E. Bouma, S. A. Boppart, C. Pitris, J. F. Southern, und J. G. Fujimoto, "In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography," *Science* **276** (1997). 10.1126/science.276.5321.2037
18. W. Drexler, M. Liu, A. Kumar, T. Kamali, A. Unterhuber, und R. A. Leitgeb, "Optical coherence tomography today: speed, contrast, and multimodality," *Journal of Biomedical Optics* **19** (2014). 10.1117/1.JBO.19.7.071412
19. M. Pieper, H. Schulz-Hildebrandt, M. A. Mall, G. Hüttmann, und P. König, "Intravital microscopic optical coherence tomography imaging to assess mucus-mobilizing interventions for muco-obstructive lung disease in mice," *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **318** (2020). 10.1152/ajplung.00287.2019
20. X. Ge, S. Chen, S. Chen, und L. Liu, "High resolution optical coherence tomography," *Journal of Lightwave Technology* **39** (2021). 10.1109/JLT.2021.3061606
21. M. Pieper, H. Schulz-Hildebrandt, I. Schmutde, K. M. Quell, Y. Laumonier, G. Hüttmann, und P. König, "Intravital imaging of mucus transport in asthmatic mice using microscopic optical coherence tomography," *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **323** (2022). 10.1152/ajplung.00455.2021
22. C. Apelian, F. Harms, O. Thouvenin, und A. C. Boccara, "Dynamic full field optical coherence tomography: subcellular metabolic contrast revealed in tissues by interferometric signals temporal analysis," *Biomed. Opt. Express* **7** (2016). 10.1364/BOE.7.001511

23. K. Groux, A. Verschueren, C. Nanteau, M. Clémentçon, M. Fink, J.-A. Sahel, C. Boccarda, M. Paques, S. Reichman, und K. Grieve, "Dynamic full-field optical coherence tomography allows live imaging of retinal pigment epithelium stress model," *Communications Biology* **5** (2022). 10.1038/s42003-022-03479-6

24. J. Scholler, V. Mazlin, O. Thouvenin, K. Groux, P. Xiao, J. A. Sahel, M. Fink, C. Boccarda, und K. Grieve, "Probing dynamic processes in the eye at multiple spatial and temporal scales with multimodal full field OCT," *Biomed. Opt. Express* **10** (2019). 10.1364/BOE.10.000731

25. H. Yang, S. Zhang, P. Liu, L. Cheng, F. Tong, H. Liu, S. Wang, M. Liu, C. Wang, Y. Peng, F. Xie, B. Zhou, Y. Cao, J. Guo, Y. Zhang, Y. Ma, D. Shen, P. Xi, und S. Wang, "Use of high-resolution full-field optical coherence tomography and dynamic cell imaging for rapid intraoperative diagnosis during breast cancer surgery," *Cancer* **126** (2020). 10.1002/cncr.32838

26. W. E. Gerabek, B. D. Haage, G. Keil, und W. Wegner, Herausgeber. *Enzyklopädie Medizingeschichte*, (De Gryter, 2007).

27. U. Welsch, W. Kummer, und T. Deller, Herausgeber. *Histologie - Das Lehrbuch*, 5 (Elsevier, 2018).

28. W. Buselmaier, und J. Haussig, *Biologie für Mediziner*, 14 (Springer, 2018).

29. C. Zalpour, Herausgeber. *Anatomie Physiologie für die Physiotherapie*, 4 (Urban & Fischer, 2016).

30. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, K. C. Martin, M. Yaffe, und A. Amon, *Molecular cell biology*, 8 (W. H. Freeman, 2016).

31. B. Alberts, R. Heald, A. Johnson, D. Morgan, R. Martin, K. Roberts, und P. Walter, *Molecular biology of the cell*, 6 (Garland Science, 2015).

32. K. Lee, K. Kim, J. Jung, J. Heo, S. Cho, S. Lee, G. Chang, Y. Jo, H. Park, und Y. Park, "Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: from principles to applications," *Sensors* **13** (2013). 10.3390/s130404170

33. R. F. Schmidt, und F. Lang, Herausgeber. *Physiologie des Menschen*, 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage (Springer, 2007).

34. M. Suissa, C. Place, E. Goillot, und E. Freyssingeas, "Internal dynamics of a living cell nucleus investigated by dynamic light scattering," *The European Physical Journal E* **26** (2008). 10.1140/epje/i2007-10346-5

35. W. Demtröder, *Experimentalphysik 2*, 6 (Springer, 2013).
36. M. Born, und E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, 7 (Cambridge University Press, 1999).
37. B. E. a. Saleh, und M. C. Teich, *Grundlagen der Photonik*, 2 (Wiley-VCH, 2008).
38. W. Lauterborn, T. Kurz, und M. Wiesenfeldt, *Kohärente Optik: Grundlagen Für Physiker und Ingenieure*, 1 (Springer, 1993).
39. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier optics*, 2 (McGraw-Hill, 1996).
40. D. G. Smith, *Field guide to physical optics*, 1 (Spie Press Book, 2013).
41. S. Van Aert, D. Van Dyck, und A. J. den Dekker, "Resolution of coherent and incoherent imaging systems reconsidered - Classical criteria and a statistical alternative," *Optics Express* **14** (2006). 10.1364/oe.14.003830
42. R. R. Alfano, Herausgeber. *The supercontinuum laser source*, 2 (Springer, 2006).
43. R. R. Alfano, und S. L. Shapiro, "Observation of self-phase modulation and small-scale filaments in crystals and glasses," *Physical Review Letters* **24** (1970). 10.1103/PhysRevLett.24.592
44. D. L. Marks, A. L. Oldenburg, J. J. Reynolds, und S. A. Boppart, "Study of an ultrahigh-numerical-aperture fiber continuum generation source for optical coherence tomography," *Opt. Lett.* **27** (2002). 10.1364/ol.27.002010
45. C. Poudel, und C. F. Kaminski, "Supercontinuum radiation in fluorescence microscopy and biomedical imaging applications," *Journal of the Optical Society of America B* **36** (2019). 10.1364/josab.36.00a139
46. G. Genty, S. Coen, und J. M. Dudley, "Fiber supercontinuum sources (Invited)," *Journal of the Optical Society of America B* **24** (2007). 10.1364/josab.24.001771
47. J. Dudley, und J. Taylor, Herausgeber. *Supercontinuum generation in optical fibers*, (Cambridge University Press, 2010).
48. J. G. Fujimoto, und W. Drexler, Herausgeber. *Optical coherence tomography*, 2 (Springer Cham, 2015).
49. B. Bouma , und G. J. Tearney, Herausgeber. *Handbook of optical coherence tomography*, (Marcel Dekker, 2002).

50. B. E. Bouma, J. F. de Boer, D. Huang, I.-K. Jang, T. Yonetsu, C. L. Leggett, R. Leitgeb, D. D. Sampson, M. Suter, B. J. Vakoc, M. Villiger, und M. Wojtkowski, "Optical coherence tomography," *Nature Reviews Methods Primers* **2** (2022). 10.1038/s43586-022-00162-2
51. A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzenberger, und T. Lasser, "Optical coherence tomography - principles and applications," *Reports on Progress in Physics* **66** (2003). 10.1088/0034-4885/66/2/204
52. S. Zheng, Y. Bai, Z. Xu, P. Liu, und G. Ni, "Optical coherence tomography for three-dimensional imaging in the biomedical field: a review," *Frontiers in Physics* **9** (2021). 10.3389/fphy.2021.744346
53. A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, G. Kamp, und S. Y. El-Zaiat, "Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry," *Optics Communications* **117** (1995). 10.1016/0030-4018(95)00119-s
54. M. Wojtkowski, T. Bajraszewski, P. Targowski, und A. Kowalczyk, "Real-time in vivo ophthalmic imaging by ultrafast spectral optical coherence tomography," in *Coherence Domain Optical Methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine VII, Proc. SPIE 4956* (2003). 10.1117/12.477634.
55. 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," *Opt. Lett.* **28** (2003). 10.1364/ol.28.002067
56. M. Choma, M. Sarunic, C. Yang, und J. Izatt, "Sensitivity advantage of swept source and fourier domain optical coherence tomography," *Optics Express* **11** (2003). 10.1364/oe.11.002183
57. R. Leitgeb, C. Hitzenberger, und A. Fercher, "Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography," *Optics Express* **11** (2003). 10.1364/oe.11.000889
58. 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]," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.003248
59. M. Wojtkowski, R. Leitgeb, A. Kowalczyk, T. Bajraszewski, und A. F. Fercher, "In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography," *Journal of Biomedical Optics* **7** (2002). 10.1117/1.1482379
60. H. Spahr, "Detektion von retinalen Mikrobewegungen mit phasensensitiver optischer Kohärenztomografie," *Dissertation, Universität zu Lübeck* (2017).

61. B. Cense, N. A. Nassif, T. C. Chen, M. C. Pierce, S.-H. Yun, B. H. Park, B. E. Bouma, G. J. Tearney, and J. F. de Boer, "Ultra-high-resolution high-speed retinal imaging using spectral-domain optical coherence tomography," *Optics Express* **12** (2004). 10.1364/OPEX.12.002435
62. J. M. Smulko, N. C. Dingari, J. S. Soares, and I. Barman, "Anatomy of noise in quantitative biological Raman spectroscopy," *Bioanalysis* **6** (2014). 10.4155/bio.13.337
63. S. Rao D. S, M. Jensen, L. Grüner-Nielsen, J. T. Olsen, P. Heiduschka, B. Kemper, J. Schnekenburger, M. Glud, M. Mogensen, N. M. Israelsen, and O. Bang, "Shot-noise limited, supercontinuum-based optical coherence tomography," *Light: Science & Applications* **10** (2021). 10.1038/s41377-021-00574-x
64. M. Jensen, I. B. Gonzalo, R. D. Engelholm, M. Maria, N. M. Israelsen, A. Podoleanu, and O. Bang, "Noise of supercontinuum sources in spectral domain optical coherence tomography," *Journal of the Optical Society of America B* **36** (2019). 10.1364/josab.36.00a154
65. N. Uribe-Patarroyo, S. H. Kassani, M. Villiger, and B. E. Bouma, "Robust wavenumber and dispersion calibration for Fourier-domain optical coherence tomography," *Optics Express* **26** (2018). 10.1364/OE.26.009081
66. B. Hyle Park, M. C. Pierce, B. Cense, S.-H. Yun, M. Mujat, G. J. Tearney, B. E. Bouma, and J. F. d. Boer, "Real-time fiber-based multi-functional spectral-domain optical coherence tomography at 1.3 μm ," *Optics Express* **13** (2005). 10.1364/OPEX.13.003931
67. M. Mujat, B. Park, B. Cense, T. Chen, and J. de Boer, "Autocalibration of spectral-domain optical coherence tomography spectrometers for in vivo quantitative retinal nerve fiber layer birefringence determination," *Journal of Biomedical Optics* **12** (2007). 10.1117/1.2764460
68. D. Lian, and H. Yonghong, "A novel spectral calibration method in spectral domain optical coherence tomography," in *Eighth International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine, Proc. SPIE 7519* (2009). 10.1117/12.843451.
69. A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, R. Zawadzki, B. Karamata, and T. Lasser, "Dispersion compensation for optical coherence tomography depth-scan signals by a numerical technique," *Optics Communications* **204** (2002). 10.1016/S0030-4018(02)01137-9
70. W. Drexler, U. Morgner, F. X. Kärtner, C. Pitris, S. A. Boppart, X. D. Li, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto, "In vivo ultra-high-resolution optical coherence tomography," *Opt. Lett.* **24** (1999). 10.1364/OL.24.001221

71. M. Wojtkowski, V. Srinivasan, T. Ko, J. Fujimoto, A. Kowalczyk, and J. Duker, "Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation," *Optics Express* **12** (2004). 10.1364/opex.12.002404
72. J. Kalkman, "Fourier-domain optical coherence tomography signal analysis and numerical modeling," *International Journal of Optics* **2017** (2017). 10.1155/2017/9586067
73. D. Hillmann, C. Lührs, T. Bonin, P. Koch, and G. Hüttmann, "Holoscopy—holographic optical coherence tomography," *Opt. Lett.* **36** (2011). 10.1364/OL.36.002390
74. M. Szkulmowski, and M. Wojtkowski, "Averaging techniques for OCT imaging," *Optics Express* **21** (2013). 10.1364/OE.21.009757
75. B. Baumann, C. W. Merkle, R. A. Leitgeb, M. Augustin, A. Wartak, M. Pircher, and C. K. Hitzenberger, "Signal averaging improves signal-to-noise in OCT images: But which approach works best, and when?," *Biomed. Opt. Express* **10** (2019). 10.1364/BOE.10.005755
76. R. Leitgeb, L. F. Schmetterer, M. Wojtkowski, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, and A. F. Fercher, "Flow velocity measurements by frequency domain short coherence interferometry," in *Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications VI, Proc. SPIE 4619* (2002). 10.1117/12.470477.
77. M. E. Brezinski, *Optical coherence tomography*, 1 (Elsevier, 2006).
78. M. Hagen-Eggert, P. Koch, and G. Hüttmann, "Analysis of the signal fall-off in spectral domain optical coherence tomography systems," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XVI, Proc. SPIE 8213* (2012). 10.1117/12.910921.
79. P. Andretzky, M. Lindner, J. Herrmann, A. Schultz, M. Konzog, F. Kiesewetter, and G. Haeusler, "Optical coherence tomography by spectral radar: dynamic range estimation and in-vivo measurements of skin," in *Optical and Imaging Techniques for Biomonitoring IV, Proc. SPIE 3567* (1999). 10.1117/12.339173.
80. M. Wojtkowski, "High-speed optical coherence tomography: basics and applications," *Biomed. Opt. Express* **49** (2010). 10.1364/AO.49.000D30
81. H. Schulz-Hildebrandt, "Mikroskopisch Optische Kohärenztomographie für die Darstellung von Mukustransport," Dissertation, Universität zu Lübeck (2018).
82. T. R. Corle, and G. S. Kino, *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*, 1 (Academic Press, 1996).

83. G. Cox, und C. J. Sheppard, "Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy," *Microscopy Research and Technique* **63** (2004). 10.1002/jemt.10423
84. E. H. Egelman, Herausgeber. *Comprehensive biophysics*, (Elsevier, 2012).
85. S. Lawman, Z. Zhang, Y.-C. Shen, und Y. Zheng, "Line field optical coherence tomography," *Photonics* **9** (2022). 10.3390/photonics9120946
86. A. Dubois, O. Levecq, H. Azimani, D. Siret, A. Barut, M. Suppa, V. Del Marmol, J. Malvehy, E. Cinotti, P. Rubegni, und J. L. Perrot, "Line-field confocal optical coherence tomography for high-resolution noninvasive imaging of skin tumors," *Journal of Biomedical Optics* **23** (2018). 10.1117/1.JBO.23.10.106007
87. L. Ginner, T. Schmoll, A. Kumar, M. Salas, N. Pricoupenko, L. M. Wurster, und R. A. Leitgeb, "Holographic line field en-face OCT with digital adaptive optics in the retina in vivo," *Biomed. Opt. Express* **9** (2018). 10.1364/BOE.9.000472
88. L. Wang, R. Fu, C. Xu, und M. Xu, "Methods and applications of full-field optical coherence tomography: a review," *Journal of Biomedical Optics* **27** (2022). 10.1117/1.JBO.27.5.050901
89. R. A. Leitgeb, "En face optical coherence tomography: a technology review [Invited]," *Biomed. Opt. Express* **10** (2019). 10.1364/BOE.10.002177
90. A. Dubois, L. Vabre, A. C. Boccara, und E. Beaurepaire, "High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope," *Applied Optics* **41** (2002). 10.1364/ao.41.000805
91. J. F. Bille, Herausgeber. *High resolution imaging in microscopy and ophthalmology*, (Springer Cham, 2019).
92. B. Považay, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, H. Arthaber, und W. Drexler, "Full-field time-encoded frequency-domain optical coherence tomography," *Optics Express* **14** (2006). 10.1364/OE.14.007661
93. 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* **6** (2016). 10.1038/srep35209
94. D. Hillmann, H. Spahr, C. Pfäffle, H. Sudkamp, G. Franke, und G. Hüttmann, "In vivo optical imaging of physiological responses to photostimulation in human photoreceptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113** (2016). 10.1073/pnas.1606428113

95. E. Auksorius, D. Borycki, and M. Wojtkowski, "Crosstalk-free volumetric in vivo imaging of a human retina with Fourier-domain full-field optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* **10** (2019). 10.1364/BOE.10.006390
96. G. Liu, Herausgeber. *Selected topics in optical coherence tomography*, (InTech, 2012).
97. A. M. Zysk, F. T. Nguyen, A. L. Oldenburg, D. L. Marks, and S. A. Boppart, "Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside," *Journal of Biomedical Optics* **12** (2007). 10.1117/1.2793736
98. J. M. Schmitt, A. Knuttel, M. Yadlowsky, and M. A. Eckhaus, "Optical-coherence tomography of a dense tissue: statistics of attenuation and backscattering," *Physics in Medicine and Biology* **39** (1994). 10.1088/0031-9155/39/10/013
99. Y. Zhao, Z. Chen, C. Saxer, S. Xiang, J. F. de Boer, and J. S. Nelson, "Phase-resolved optical coherence tomography and optical Doppler tomography for imaging blood flow in human skin with fast scanning speed and high velocity sensitivity," *Opt. Lett.* **25** (2000). 10.1364/OL.25.000114
100. Z. Chen, T. E. Milner, D. Dave, and J. S. Nelson, "Optical Doppler tomographic imaging of fluid flow velocity in highly scattering media," *Opt. Lett.* **22** (1997). 10.1364/OL.22.000064
101. R. A. Leitgeb, R. M. Werkmeister, C. Blatter, and L. Schmetterer, "Doppler optical coherence tomography," *Progress in Retinal and Eye Research* **41** (2014). 10.1016/j.preteyeres.2014.03.004
102. J. K. Barton, and S. Stromski, "Flow measurement without phase information in optical coherence tomography images," *Optics Express* **13** (2005). 10.1364/OPEX.13.005234
103. M. S. Mahmud, D. W. Cadotte, B. Vuong, C. Sun, T. W. Luk, A. Mariampillai, and V. X. Yang, "Review of speckle and phase variance optical coherence tomography to visualize microvascular networks," *Journal of Biomedical Optics* **18** (2013). 10.1117/1.JBO.18.5.050901
104. A. H. Kashani, C. L. Chen, J. K. Gahm, F. Zheng, G. M. Richter, P. J. Rosenfeld, Y. Shi, and R. K. Wang, "Optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications," *Progress in Retinal and Eye Research* **60** (2017). 10.1016/j.preteyeres.2017.07.002

105. T. E. de Carlo, A. Romano, N. K. Waheed, and J. S. Duker, "A review of optical coherence tomography angiography (OCTA)," *Int J Retina Vitreous* **1** (2015). 10.1186/s40942-015-0005-8
106. R. F. Spaide, J. G. Fujimoto, N. K. Waheed, S. R. Sadda, and G. Staurengi, "Optical coherence tomography angiography," *Progress in Retinal and Eye Research* **64** (2018). 10.1016/j.preteyeres.2017.11.003
107. D. M. Sampson, A. M. Dubis, F. K. Chen, R. J. Zawadzki, and D. D. Sampson, "Towards standardizing retinal optical coherence tomography angiography: a review," *Light: Science & Applications* **11** (2022). 10.1038/s41377-022-00740-9
108. J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging," *Nature Biotechnology* **21** (2003). 10.1038/nbt892
109. J. Mo, X. Yu, and L. Liu, "High resolution optical coherence tomography for bio-imaging," *Frontiers in Biophotonics for Translational Medicine: In the Celebration of Year of Light (2015)* **639798** (2015). 10.1007/978-981-287-627-0_6
110. X. Shu, L. Beckmann, and H. Zhang, "Visible-light optical coherence tomography: a review," *Journal of Biomedical Optics* **22** (2017). 10.1117/1.JBO.22.12.121707
111. L. Liu, J. A. Gardecki, S. K. Nadkarni, J. D. Toussaint, Y. Yagi, B. E. Bouma, and G. J. Tearney, "Imaging the subcellular structure of human coronary atherosclerosis using micro-optical coherence tomography," *Nature Medicine* **17** (2011). 10.1038/nm.2409
112. 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, and G. J. Tearney, "Method for quantitative study of airway functional microanatomy using micro-optical coherence tomography," *PLoS One* **8** (2013). 10.1371/journal.pone.0054473
113. P. J. Marchand, A. Bouwens, D. Szlag, D. Nguyen, A. Descloux, M. Sison, S. Coquoz, J. Extermann, and T. Lasser, "Visible spectrum extended-focus optical coherence microscopy for label-free sub-cellular tomography," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.003343
114. I. Grulkowski, K. Szulzycki, and M. Wojtkowski, "Microscopic OCT imaging with focus extension by ultrahigh-speed acousto-optic tunable lens and stroboscopic illumination," *Optics Express* **22** (2014). 10.1364/OE.22.031746
115. C. Canavesi, and J. P. Rolland, "Ten years of gabor-domain optical coherence microscopy," *Applied Sciences* **9** (2019)

116. T. S. Ralston, D. L. Marks, P. S. Carney, and S. A. Boppart, "Inverse scattering for optical coherence tomography," *Journal of the Optical Society of America A* **23** (2006). 10.1364/josaa.23.001027
117. H. Schulz-Hildebrandt, M. Münter, M. Ahrens, D. Hillmann, P. König, G. Hüttmann, und H. Spahr, "Coherence and diffraction limited resolution in microscopic OCT by a unified approach for the correction of dispersion and aberrations," in *2nd Canterbury Conference on OCT with Emphasis on Broadband Optical Sources, Proc. SPIE 10591* (2018). 10.1117/12.2303755.
118. R. N. Graf, W. J. Brown, und A. Wax, "Parallel frequency-domain optical coherence tomography scatter-mode imaging of the hamster cheek pouch using a thermal light source," *Opt. Lett.* **33** (2008). 10.1364/OL.33.001285
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.* **41** (2016). 10.1364/OL.41.005620
120. A. Dubois, O. Levecq, H. Azimani, A. Davis, J. Ogien, D. Siret, und A. Barut, "Line-field confocal time-domain optical coherence tomography with dynamic focusing," *Optics Express* **26** (2018). 10.1364/OE.26.033534
121. L. van Manen, J. Dijkstra, C. Boccarda, E. Benoit, A. L. Vahrmeijer, M. J. Gora, und J. S. D. Mieog, "The clinical usefulness of optical coherence tomography during cancer interventions," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **144** (2018). 10.1007/s00432-018-2690-9
122. S. A. Boppart, B. E. Bouma, C. Pitris, J. F. Southern, M. E. Brezinski, und J. G. Fujimoto, "In vivo cellular optical coherence tomography imaging," *Nature Medicine* **4** (1998). 10.1038/nm0798-861
123. A. L. Oldenburg, R. K. Chhetri, D. B. Hill, und B. Button, "Monitoring airway mucus flow and ciliary activity with optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* **3** (2012). 10.1364/BOE.3.001978
124. 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," *Biomed. Opt. Express* **7** (2016). 10.1364/BOE.7.002494
125. A. E. Tilley, M. S. Walters, R. Shaykhiev, und R. G. Crystal, "Cilia dysfunction in lung disease," *Annual Review of Physiology* **77** (2015). 10.1146/annurev-physiol-021014-071931

126. P. Zhang, E. B. Miller, S. K. Manna, R. K. Meleppat, E. N. Pugh, Jr., and R. J. Zawadzki, "Temporal speckle-averaging of optical coherence tomography volumes for in-vivo cellular resolution neuronal and vascular retinal imaging," *Neurophotonics* **6** (2019). 10.1117/1.NPh.6.4.041105
127. T. M. Jorgensen, J. Thomadsen, U. Christensen, W. Soliman, and B. Sander, "Enhancing the signal-to-noise ratio in ophthalmic optical coherence tomography by image registration--method and clinical examples," *Journal of Biomedical Optics* **12** (2007). 10.1117/1.2772879
128. O. Liba, M. D. Lew, E. D. SoRelle, R. Dutta, D. Sen, D. M. Moshfeghi, S. Chu, and A. de la Zerda, "Speckle-modulating optical coherence tomography in living mice and humans," *Nature Communications* **8** (2017). 10.1038/ncomms15845
129. K. Jeong, J. J. Turek, and D. D. Nolte, "Volumetric motility-contrast imaging of tissue response to cytoskeletal anti-cancer drugs," *Optics Express* **15** (2007). 10.1364/oe.15.014057
130. A. L. Oldenburg, R. K. Chhetri, J. M. Cooper, W. C. Wu, M. A. Troester, and J. B. Tracy, "Motility-, autocorrelation-, and polarization-sensitive optical coherence tomography discriminates cells and gold nanorods within 3D tissue cultures," *Opt. Lett.* **38** (2013). 10.1364/OL.38.002923
131. A. L. Oldenburg, X. Yu, T. Gilliss, O. Alabi, R. M. Taylor, and M. A. Troester, "Inverse-power-law behavior of cellular motility reveals stromal-epithelial cell interactions in 3D co-culture by OCT fluctuation spectroscopy," *Optica* **2** (2015). 10.1364/OPTICA.2.000877
132. J. Kalkman, R. Sprik, and T. G. van Leeuwen, "Path-length-resolved diffusive particle dynamics in spectral-domain optical coherence tomography," *Physical Review Letters* **105** (2010). 10.1103/PhysRevLett.105.198302
133. J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical Reviews* **8** (2016). 10.1007/s12551-016-0218-6
134. G. Farhat, A. Mariampillai, V. X. Yang, G. Czarnota, and M. Kolios, "Optical coherence tomography speckle decorrelation for detecting cell death," in *Biomedical Applications of Light Scattering V, Proc. SPIE 7907* (2011). 10.1117/12.874682.
135. G. Farhat, A. Miriampillai, V. Yang, G. Czarnota, and M. Kolios, "Detecting apoptosis using dynamic light scattering with optical coherence tomography," *Journal of Biomedical Optics* **16** (2011). 10.1117/1.3600770

136. N. J. J. Arezza, M. Razani, und M. C. Kolios, "Dynamic light scattering optical coherence tomography to probe motion of subcellular scatterers," *Journal of Biomedical Optics* **24** (2019). 10.1117/1.JBO.24.2.025002
137. J. Lee, H. Radhakrishnan, W. Wu, A. Daneshmand, M. Klimov, C. Ayata, und D. A. Boas, "Quantitative imaging of cerebral blood flow velocity and intracellular motility using dynamic light scattering–optical coherence tomography," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **33** (2013). 10.1038/jcbfm.2013.20
138. I. A. El-Sadek, A. Miyazawa, L. Tzu-Wei Shen, S. Makita, S. Fukuda, T. Yamashita, Y. Oka, P. Mukherjee, S. Matsusaka, T. Oshika, H. Kano, und Y. Yasuno, "Optical coherence tomography-based tissue dynamics imaging for longitudinal and drug response evaluation of tumor spheroids," *Biomed. Opt. Express* **11** (2020). 10.1364/BOE.404336
139. I. A. El-Sadek, A. Miyazawa, L. T.-W. Shen, S. Makita, P. Mukherjee, A. Lichtenegger, S. Matsusaka, und Y. Yasuno, "Three-dimensional dynamics optical coherence tomography for tumor spheroid evaluation," *Biomed. Opt. Express* **12** (2021). 10.1364/BOE.440444
140. M. Ulrich, L. Themstrup, N. de Carvalho, M. Manfredi, C. Grana, S. Ciardo, R. Kastle, J. Holmes, R. Whitehead, G. B. Jemec, G. Pellacani, und J. Welzel, "Dynamic optical coherence tomography in dermatology," *Dermatology* **232** (2016). 10.1159/000444706
141. W. Tan, A. L. Oldenburg, J. J. Norman, T. A. Desai, und S. A. Boppart, "Optical coherence tomography of cell dynamics in three-dimensional tissue models," *Optics Express* **14** (2006). 10.1364/oe.14.007159
142. A. Dubois, *Handbook of full-field optical coherence microscopy*, 1 (Pan Stanford Publishing Pte, 2016).
143. C. E. Leroux, F. Bertillot, O. Thouvenin, und A. C. Boccara, "Intracellular dynamics measurements with full field optical coherence tomography suggest hindering effect of actomyosin contractility on organelle transport," *Biomed. Opt. Express* **7** (2016). 10.1364/BOE.7.004501
144. O. Thouvenin, C. Apelian, A. Nahas, M. Fink, und C. Boccara, "Full-field optical coherence tomography as a diagnosis tool: recent progress with multimodal imaging," *Applied Sciences* **7** (2017). 10.3390/app7030236
145. O. Thouvenin, C. Boccara, M. Fink, J. Sahel, M. Paques, und K. Grieve, "Cell motility as contrast agent in retinal explant imaging with full-field optical coherence tomography," *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **58** (2017). 10.1167/iovs.17-22375

146. O. Thouvenin, K. Grieve, P. Xiao, C. Apelian, and A. C. Boccara, "En face coherence microscopy [Invited]," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.000622
147. O. Thouvenin, "Optical 3D imaging of subcellular dynamics in biological cultures and tissues: Applications to ophthalmology and neuroscience," Université Sorbonne Paris (2017).
148. G. Popescu, Y. Park, W. Choi, R. R. Dasari, M. S. Feld, and K. Badizadegan, "Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy," *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **41** (2008). 10.1016/j.bcmd.2008.01.010
149. G. Popescu, *Quantitative phase imaging of cells and tissues*, 1 (McGraw-Hill Education, 2011).
150. C. Apelian, C. Gastaud, and A. C. Boccara, "Extracting relevant information for cancer diagnosis from dynamic full field OCT through image processing and learning," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXI, Proc. SPIE 10053* (2017). 10.1117/12.2254824.
151. D. Merrill, R. An, H. Sun, B. Yakubov, D. Matei, J. Turek, and D. Nolte, "Intracellular doppler signatures of platinum sensitivity captured by biodynamic profiling in ovarian xenografts," *Scientific Reports* **6** (2016). 10.1038/srep18821
152. H. M. Leung, M. L. Wang, H. Osman, E. Abouei, C. MacAulay, M. Follen, J. A. Gardecki, and G. J. Tearney, "Imaging intracellular motion with dynamic micro-optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* **11** (2020). 10.1364/BOE.390782
153. Teledyne e2v, "OctoPlus datasheet," V2.04, 23. Juli 2018.
154. Basler AG, "Sprint SpL4096 140km datasheet," AW000162, 17. Juli 2017.
155. O. Schrey, W. Brockherde, C. Nitta, B. Bechen, E. Bodenstorfer, J. Brodersen, and K. J. Mayer, "Tri-linear color multi-linescan sensor with 200 kHz line rate," *Solid-State Electronics* **125** (2016). 10.1016/j.sse.2016.05.012
156. European Machine Vision Association, "EMVA standard 1288, standard for characterization of image sensors and cameras," Release 4.0 General, 21. Juni 2021.
157. J. A. Nelder, and R. Mead, "A simplex method for function minimization," *The Computer Journal* **7** (1965). 10.1093/comjnl/7.4.308

158. J. R. Fienup, und J. J. Miller, "Aberration correction by maximizing generalized sharpness metrics," *Journal of the Optical Society of America A* **20** (2003). 10.1364/josaa.20.000609
159. A. Agrawal, T. J. Pfefer, P. D. Woolliams, P. H. Tomlins, und G. Nehmetallah, "Methods to assess sensitivity of optical coherence tomography systems," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.000902
160. J. M. Blackledge, *Digital image processing*, 1 (Horwood Publishing, 2005).
161. F. P. Oliveira, und J. M. Tavares, "Medical image registration: a review," *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* **17** (2014). 10.1080/10255842.2012.670855
162. H. Handels, *Medizinische Bildverarbeitung*, 2 (Vieweg+Teubner, 2009).
163. B. S. Reddy, und B. N. Chatterji, "An FFT-based technique for translation, rotation, and scale-invariant image registration," *IEEE Trans Image Process* **5** (1996). 10.1109/83.506761
164. J. Canny, "A computational approach to edge detection," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **PAMI-8** (1986). 10.1109/TPAMI.1986.4767851
165. H. Ammari, F. Romero, und C. Shi, "A signal separation technique for sub-cellular imaging using dynamic optical coherence tomography," *Multiscale Modeling & Simulation* **15** (2017). 10.1137/16m1090387
166. I. T. Jolliffe, und J. Cadima, "Principal component analysis: a review and recent developments," *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374** (2016). 10.1098/rsta.2015.0202
167. A. Mariampillai, M. K. K. Leung, M. Jarvi, B. A. Standish, K. Lee, B. C. Wilson, A. Vitkin, und V. X. D. Yang, "Optimized speckle variance OCT imaging of microvasculature," *Opt. Lett.* **35** (2010). 10.1364/OL.35.001257
168. J. Scholler, "Motion artifact removal and signal enhancement to achieve in vivo dynamic full field OCT," *Optics Express* **27** (2019). 10.1364/OE.27.019562
169. T. Kohlfaerber, M. Pieper, M. Münter, C. Holzhausen, M. Ahrens, C. Idel, K.-L. Bruchhage, A. Leichtle, P. König, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Dynamic microscopic optical coherence tomography to visualize the morphological and functional micro-anatomy of the airways," *Biomed. Opt. Express* **13** (2022). 10.1364/BOE.456104

170. M. Münter, M. Pieper, T. Kohlfaerber, E. Bodenstorfer, M. Ahrens, C. Winter, R. Huber, P. König, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Microscopic optical coherence tomography (mOCT) at 600 kHz for 4D volumetric imaging and dynamic contrast," *Biomed. Opt. Express* **12** (2021). 10.1364/BOE.425001
171. M. Münter, M. Vom Endt, M. Pieper, M. Casper, M. Ahrens, T. Kohlfaerber, R. Rahmzadeh, P. König, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Dynamic contrast in scanning microscopic OCT," *Opt. Lett.* **45** (2020). 10.1364/OL.396134
172. M. Münter, H. Schulz-Hildebrandt, M. Pieper, P. König, und G. Hüttmann, "4D microscopic optical coherence tomography imaging of ex vivo mucus transport," in *Clinical and Preclinical Optical Diagnostics II, Proc. SPIE EB101* (Munich, 2019). 10.1117/12.2527138.
173. 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, und A. Cardona, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nature Methods* **9** (2012). 10.1038/nmeth.2019
174. E. Houtmeyers, R. Gosselink, G. Gayan-Ramirez, und M. Decramer, "Regulation of mucociliary clearance in health and disease," *European Respiratory Journal* **13** (1999)
175. 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* **23** (2015). 10.1364/OE.23.023217
176. M. A. Chilvers, und C. O'Callaghan, "Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods," *Thorax* **55** (2000). 10.1136/thorax.55.4.314
177. S. Kretschmer, M. Pieper, G. Hüttmann, T. Bölke, B. Wollenberg, L. M. Marsh, H. Garn, und P. König, "Autofluorescence multiphoton microscopy for visualization of tissue morphology and cellular dynamics in murine and human airways," *Laboratory Investigation* **96** (2016). 10.1038/labinvest.2016.69
178. A. Rakhymzhan, L. Reuter, R. Raspe, D. Bremer, R. Günther, R. Leben, J. Heidelin, V. Andresen, S. Cheremukhin, H. Schulz-Hildebrandt, M. G. Bixel, R. H. Adams, H. Radbruch, G. Hüttmann, A. E. Hauser, und R. A. Niesner, "Coregistered spectral optical coherence tomography and two-photon microscopy for multimodal near-instantaneous deep-tissue imaging," *Cytometry Part A* **97** (2020). 10.1002/cyto.a.24012
179. EMVA – European Machine Vision Association, "GenICam standard," 2.1.1.

180. M. J. Ju, M. Heisler, A. Athwal, M. V. Sarunic, and Y. Jian, "Effective bidirectional scanning pattern for optical coherence tomography angiography," *Biomed. Opt. Express* **9** (2018). 10.1364/BOE.9.002336
181. V. F. Duma, P. Tankam, J. Huang, J. Won, and J. P. Rolland, "Optimization of galvanometer scanning for optical coherence tomography," *Applied Optics* **54** (2015). 10.1364/AO.54.005495
182. W. J. Smith, *Modern optical engineering: the design of optical systems*, 4 (McGraw-Hill Education, 2008).
183. J. W. Dobrucki, D. Feret, and A. Noatynska, "Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies," *Biophysical Journal* **93** (2007). 10.1529/biophysj.106.096636
184. J. Scholler, K. Groux, O. Goureau, J. A. Sahel, M. Fink, S. Reichman, C. Boccara, and K. Grieve, "Dynamic full-field optical coherence tomography: 3D live-imaging of retinal organoids," *Light: Science & Applications* **9** (2020). 10.1038/s41377-020-00375-8
185. M. Kraus, "Motion correction and signal enhancement in optical coherence tomography," Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (2017).
186. Y. Chen, Y.-J. Hong, S. Makita, and Y. Yasuno, "Three-dimensional eye motion correction by Lissajous scan optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.001783
187. J. P. Kolb, T. Pfeiffer, M. Eibl, H. Hakert, and R. Huber, "High-resolution retinal swept source optical coherence tomography with an ultra-wideband Fourier-domain mode-locked laser at MHz A-scan rates," *Biomed. Opt. Express* **9** (2018). 10.1364/BOE.9.000120
188. H. M. Leung, L. Yu, D. M. Thompson, Y. Sun, A. L. Gregg, J. A. Gardecki, R. W. Jenkins, O. Jonas, and G. Tearney, J., "Applications of dynamic micro-optical coherence tomography," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXV, Proc. SPIE 11630* (2021). 10.1117/12.2583649.
189. W. J. Brown, S. Kim, and A. Wax, "Noise characterization of supercontinuum sources for low-coherence interferometry applications," *Journal of the Optical Society of America A* **31** (2014). 10.1364/JOSAA.31.002703
190. C. Chen, W. Shi, R. Reyes, and V. X. D. Yang, "Buffer-averaging super-continuum source based spectral domain optical coherence tomography for high speed imaging," *Biomed. Opt. Express* **9** (2018). 10.1364/BOE.9.006529

191. O. P. Kocaoglu, T. L. Turner, Z. Liu, und D. T. Miller, "Adaptive optics optical coherence tomography at 1 MHz," *Biomed. Opt. Express* **5** (2014). 10.1364/BOE.5.004186
192. J. P. Kolb, T. Klein, W. Wieser, W. Draxinger, und R. Huber, "Full volumetric video rate OCT of the posterior eye with up to 195.2 volumes/s," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XIX, Proc. SPIE 9312* (2015). 10.1117/12.2077147.
193. E. C. Jensen, "Overview of live-cell imaging: requirements and methods used," *The Anatomical Record* **296** (2013). 10.1002/ar.22554
194. A. D. Elliott, "Confocal microscopy: principles and modern practices," *Current Protocols in Cytometry* **92** (2020). 10.1002/cpcy.68
195. E. A. Specht, E. Braselmann, und A. E. Palmer, "A critical and comparative review of fluorescent tools for live-cell imaging," *Annual Review of Physiology* **79** (2017). 10.1146/annurev-physiol-022516-034055
196. L. E. Smith, R. Smallwood, und S. Macneil, "A comparison of imaging methodologies for 3D tissue engineering," *Microscopy Research and Technique* **73** (2010). 10.1002/jemt.20859
197. B. W. Graf, und S. A. Boppart, "Imaging and analysis of three-dimensional cell culture models," in *Live Cell Imaging: Methods and Protocols*, D. B. Papkovsky, Herausgeber. (Humana Press, 2010), S. 211-227.
198. T. Klein, und R. Huber, "High-speed OCT light sources and systems [Invited]," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.000828
199. W. Song, L. Chen, L. Han, A. Martinez, und K. Bizheva, "400kHz, 1 μ m axial resolution SD-OCT for ophthalmic applications," in *Ophthalmic Technologies XXXII, Proc. SPIE 11941* (2022). 10.1117/12.2609048.
200. B. Tan, Z. Hosseinaee, L. Han, O. Kralj, L. Sorbara, und K. Bizheva, "250 kHz, 1.5 microm resolution SD-OCT for in-vivo cellular imaging of the human cornea," *Biomed. Opt. Express* **9** (2018). 10.1364/BOE.9.006569
201. R. Wang, J. X. Yun, X. Yuan, R. Goodwin, R. R. Markwald, und B. Z. Gao, "Megahertz streak-mode Fourier domain optical coherence tomography," *Journal of Biomedical Optics* **16** (2011). 10.1117/1.3593149
202. D. H. Choi, H. Hiro-Oka, K. Shimizu, und K. Ohbayashi, "Spectral domain optical coherence tomography of multi-MHz A-scan rates at 1310 nm range and real-time 4D-display up to 41 volumes/second," *Biomed. Opt. Express* **3** (2012). 10.1364/BOE.3.003067

203. L. Ginner, A. Kumar, D. Fechtig, L. M. Wurster, M. Salas, M. Pircher, and R. A. Leitgeb, "Noniterative digital aberration correction for cellular resolution retinal optical coherence tomography in vivo," *Optica* **4** (2017). 10.1364/optica.4.000924
204. Z. Yaqoob, J. Wu, and C. Yang, "Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy," *BioTechniques* **39** (2005). 10.2144/000112090
205. I. Grulkowski, J. J. Liu, B. Potsaid, V. Jayaraman, C. D. Lu, J. Jiang, A. E. Cable, J. S. Duker, and J. G. Fujimoto, "Retinal, anterior segment and full eye imaging using ultrahigh speed swept source OCT with vertical-cavity surface emitting lasers," *Biomed. Opt. Express* **3** (2012). 10.1364/BOE.3.002733
206. S. H. Yun, G. J. Tearney, J. F. de Boer, N. Iftimia, and B. E. Bouma, "High-speed optical frequency-domain imaging," *Optics Express* **11** (2003). 10.1364/OE.11.002953
207. B. Potsaid, B. Baumann, D. Huang, S. Barry, A. E. Cable, J. S. Schuman, J. S. Duker, and J. G. Fujimoto, "Ultrahigh speed 1050nm swept source/Fourier domain OCT retinal and anterior segment imaging at 100,000 to 400,000 axial scans per second," *Optics Express* **18** (2010). 10.1364/OE.18.020029
208. W. Wieser, B. R. Biedermann, T. Klein, C. M. Eigenwillig, and R. Huber, "Multi-megahertz OCT: High quality 3D imaging at 20 million A-scans and 4.5 GVoxels per second," *Optics Express* **18** (2010). 10.1364/OE.18.014685
209. E. Auksorius, D. Borycki, P. Stremplewski, K. Lizewski, S. Tomczewski, P. Niedzwiedziuk, B. L. Sikorski, and M. Wojtkowski, "In vivo imaging of the human cornea with high-speed and high-resolution Fourier-domain full-field optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* **11** (2020). 10.1364/BOE.393801
210. A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, and C. Boccara, "Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography," *Applied Optics* **43** (2004). 10.1364/ao.43.002874
211. T. S. Ralston, D. L. Marks, P. S. Carney, and S. A. Boppart, "Interferometric synthetic aperture microscopy," *Nature Physics* **3** (2007). 10.1038/nphys514
212. A. Dutt, and V. Rokhlin, "Fast fourier transforms for nonequispaced data," *SIAM Journal on Scientific Computing* **14** (1993). 10.1137/0914081
213. D. Hillmann, G. Hüttmann, and P. Koch, "Using nonequispaced fast Fourier transformation to process optical coherence tomography signals," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques IV, Proc. SPIE 7372* (2009). 10.1117/12.831789.

214. K. Zhang, and J. U. Kang, "Real-time 4D signal processing and visualization using graphics processing unit on a regular nonlinear-k Fourier-domain OCT system," *Optics Express* **18** (2010). 10.1364/oe.18.011772
215. A. Oldenburg, P. Ji, X. Yu, and L. Yang, "Temporal non-uniform compressive sampling for dynamic optical coherence tomography," *Optica Open* (2023). 10.1364/opticaopen.21983354.v1
216. Y. Z. Liu, F. A. South, Y. Xu, P. S. Carney, and S. A. Boppart, "Computational optical coherence tomography [Invited]," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.001549
217. K.-S. Lee, and J. P. Rolland, "Bessel beam spectral-domain high-resolution optical coherence tomography with micro-optic axicon providing extended focusing range," *Opt. Lett.* **33** (2008). 10.1364/OL.33.001696
218. J. Wang, Y. Xu, and S. A. Boppart, "Review of optical coherence tomography in oncology," *Journal of Biomedical Optics* **22** (2017). 10.1117/1.JBO.22.12.121711
219. B. J. Vakoc, D. Fukumura, R. K. Jain, and B. E. Bouma, "Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential," *Nature Reviews Cancer* **12** (2012). 10.1038/nrc3235
220. J. Mourant, R. , M. Canpolat, C. Brocker, O. Esponda-Ramos, T. M. Johnson, A. Matanock, K. S. Stetter, and J. Freyer, "Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status," *Journal of Biomedical Optics* **5** (2000). 10.1117/1.429979
221. H. Schulz-Hildebrandt, T. Pfeiffer, T. Eixmann, S. Lohmann, M. Ahrens, J. Rehra, W. Draxinger, P. König, R. Huber, and G. Hüttmann, "High-speed fiber scanning endoscope for volumetric multi-megahertz optical coherence tomography," *Opt. Lett.* **43** (2018). 10.1364/OL.43.004386
222. 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** (2018). 10.1364/BOE.9.000636
223. M. J. Gora, M. J. Suter, G. J. Tearney, and X. Li, "Endoscopic optical coherence tomography: technologies and clinical applications [Invited]," *Biomed. Opt. Express* **8** (2017). 10.1364/BOE.8.002405

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eukaryotische Zellen.....	5
Abbildung 2: Zytoskelett einer wandernden Zelle.....	6
Abbildung 3: Auflösungsvermögen und Eindringtiefe von OCT.....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines TD-OCT Aufbaus.....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines SD-OCT Aufbaus.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines A-Scans in der FD-OCT.....	21
Abbildung 7: OCT-Signalrekonstruktion.....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips.....	29
Abbildung 9: Gegenüberstellung von scannender OCT zu Full-Field OCT.....	31
Abbildung 10: μ OCT-Aufnahme einer exzidierten Luftröhre des Schweines.....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung des FF-TD-OCT Aufbaus.....	38
Abbildung 12: OCT mit dynamischen OCT-Kontrast.....	39
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus zur mikroskopischen OCT.....	41
Abbildung 14: mOCT-Aufbau.....	42
Abbildung 15: Strahlungsfluss auf einer Probe des Leistungskontrollparameters.....	48
Abbildung 16: Schematische Darstellung der FFT basierten dynamischen OCT-Auswertung.....	51
Abbildung 17: LightCT.....	54
Abbildung 18: Probenhalter mit Probe.....	55
Abbildung 19: Batch-Prozessierungs-Software zur Auswertung der OCT Daten.....	57
Abbildung 20: OCT und dOCT Aufnahme von ex vivo Mauseleber.....	60
Abbildung 21: Exemplarische en face dmOCT Bilder aus verschiedenen Tiefen.....	62
Abbildung 22: Frequenzanalyse eines en face Bildes mit mOCT und dmOCT (FFT).....	63
Abbildung 23: dmOCT B-Scan von ex vivo Mauszunge.....	65
Abbildung 24: dmOCT in Abhängigkeit zu unterschiedlich simulierter axialer Auflösung.....	68
Abbildung 25: Kontrast-Rausch-Verhältnis (CNR).....	70
Abbildung 26: Auswertung der Phase der Messung der ex vivo Mauszunge.....	71
Abbildung 27: Phasenbasierte dmOCT.....	73
Abbildung 28: dmOCT B-Scan Zeitserie von ex vivo Mastrachea.....	75
Abbildung 29: dmOCT B-Scan (FFT Grünkanal) von ex vivo Mastrachea.....	76
Abbildung 30: Vergleich drei versch. Alg. zur Berechnung von dmOCT Bildern der Zunge.....	78
Abbildung 31: Vergleich drei versch. Alg. zur Berechnung von dmOCT Bildern der Leber.....	79
Abbildung 32: Vergleich drei versch. Alg. zur Berechnung von dmOCT Bildern der Trachea.....	80
Abbildung 33: LabVIEW-Programm zur Ansteuerung der xposure-Zeilenkamera.....	82

<i>Abbildung 34: Schematische Darstellung von Scanmustern für die scanning OCT.....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 35: Messung von SNR und Roll-Off des OctoPlus-Spektrometer</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 36: SNR und Roll-Off des xposure-Spektrometer</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 37: Laterale Auflösung des mOCT-Aufbaus</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 38: Bestimmung des Bildfelds des mOCT-Aufbaus</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 39: 4D OCT-Aufnahme von ex vivo Mastrachea.....</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 40: Volumenbasierte dmOCT-Bildgebung an ex vivo Mausleber</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 41: Voxelrate und Auflösung verschiedener OCT-Systeme.....</i>	<i>106</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Wichtigste Kenndaten der im mOCT verwendeten Zeilenkameras.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 2: Spezifikationen des FF-TD-OCT Aufbaus [144, 168].....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 3: Sensitivität in Abhängigkeit zur A-Scan Rate für das OctoPlus-Spektrometer.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabelle 4: Sensitivität in Abhängigkeit zur A-Scan Rate für das xposure-Spektrometer</i>	<i>88</i>

Anhang

A.1 Publikationsliste

Paper

1. T. Kohlfärber, M. Pieper, M. Münter, C. Holzhausen, M. Ahrens, C. Idel, K.-L. Bruchhage, A. Leichtle, P. König, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Dynamic microscopic optical coherence tomography to visualize the morphological and functional micro-anatomy of the airways," *Biomedical Optics Express* **13** (2022). 10.1364/BOE.456104
2. M. Münter, M. Pieper, T. Kohlfärber, E. Bodenstorfer, M. Ahrens, C. Winter, R. Huber, P. König, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Microscopic optical coherence tomography (mOCT) at 600 kHz for 4D volumetric imaging and dynamic contrast," *Biomedical Optics Express* **12** (2021). 10.1364/BOE.425001
3. M. Münter, M. Vom Endt, M. Pieper, M. Casper, M. Ahrens, T. Kohlfaerber, R. Rahmzadeh, P. König, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Dynamic contrast in scanning microscopic OCT," *Optics Letters* **45** (2020). 10.1364/OL.396134
4. Verbytskyi, M. Münter, C. Buj, und R. Brinkmann, "A problem of a displacement calculation of tissue surface in non-contact photoacoustic tomography," *Research Bulletin of the National Technical University of Ukraine "Kyiv Politechnic Institute"* **2** (2017). 10.20535/1810-0546.2017.2.98021
5. Y. Miura, J. Prüssner, C. L. Mertineit, K. Kern, M. Münter, M. Moltmann, V. Danicke, und R. Brinkmann, "Continuous-wave thulium laser for heating cultured cells to investigate cellular thermal effects," *J Vis Exp* **124** (2017). 10.3791/54326
6. C. Buj, M. Münter, B. Schmarbeck, J. Horstmann, G. Hüttmann, und R. Brinkmann, "Noncontact holographic detection for photoacoustic tomography," *J Biomed Opt* **22** (2017). 10.1117/1.JBO.22.10.106007
7. J. Horstmann, H. Spahr, C. Buj, M. Münter, und R. Brinkmann, "Full-field speckle interferometry for non-contact photoacoustic tomography," *Phys Med Biol* **60** (2015). 10.1088/0031-9155/60/10/4045

8. C. Buj, J. Horstmann, M. Münter, und R. Brinkmann, "Speckle-based off-axis holographic detection for non-contact photoacoustic tomography," *Current Directions in Biomedical Engineering* **1** (2015). 10.1515/cdbme-2015-0088
9. C. Buj, J. Horstmann, M. Münter, und R. Brinkmann, "Speckle-based holographic detection for non-contact photoacoustic tomograph," *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik* **59** (2014). 10.1515/bmt-2014-5011

Vorträge & Proceedings

1. F. Hilge, H. Schulz-Hildebrandt, M. Wang-Evers, N. Salma, M. Ahrens, M. Münter, G. Hüttmann, R. Birngruber, und D. Manstein, "Effects on dynamic-microscopic OCT signals after manipulation of keratinocyte metabolism in an in-vitro skin model by temperature and with metabolic reagents," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXVI, SPIE PC11948* (2022). 10.1117/12.2612879
2. H. Schulz-Hildebrandt, M. Ahrens, M. Münter, E. Wilken, T. Kohlfärber, C. Holzhausen, P. König, und G. Hüttmann, "Endo-microscopic optical coherence tomography (emOCT) with dynamic contrast," in *Endoscopic Microscopy XVI, Proc. SPIE 11620* (2021). 10.1117/12.2575733
3. T. Kohlfärber, M. Münter, M. Pieper, P. König, R. Rahmanzadeh, G. Hüttmann, und H. Schulz-Hildebrandt, "Comparison between dynamic microscopic OCT and autofluorescence multiphoton microscopy for label-free analysis of murine trachea," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXV, Proc. SPIE 11630* (2021). 10.1117/12.2583811
4. M. Münter, H. Schulz-Hildebrandt, M. Pieper, P. König, und G. Hüttmann, "4D microscopic optical coherence tomography imaging of ex vivo mucus transport," in *Optical Coherence Imaging Techniques and Imaging in Scattering Media III, Proc. SPIE EB105* (2019). 10.1117/12.2527138
5. H. Schulz-Hildebrandt, M. Ahrens, M. Münter, M. Pieper, P. König und G. Hüttmann, "Towards optical biopsy enabled by microscopical optical coherence tomography," in *VII International Symposium; Topical Problems of Biophotonics 2019 [invited]* (2019).

6. H. Schulz-Hildebrandt, M. Münter, M. Ahrens, D. Hillmann, P. König, G. Hüttmann, und H. Spahr, "Coherence and diffraction limited resolution in microscopic OCT by a unified approach for the correction of dispersion and aberrations," in *2nd Canterbury Conference on OCT with Emphasis on Broadband Optical Sources, Proc. SPIE 10591* (2018). 10.1117/12.2303755
7. C. Buj, J. Horstmann, M. Münter, und R. Brinkmann, "Holographic detection for non-contact photoacoustic tomography," in *Student Conference Medical Engineering Science 2014* (2014).
8. M. Münter, C. Buj, J. Horstmann, und R. Brinkmann, "Implementation of a reconstruction algorithm for photoacoustic tomography," in *Student Conference Medical Engineering Science 2014* (2014).

Vorträge

1. G. Hüttmann, T. Kohlfärber, M. Pieper, M. Münter, C. Holzhausen, M. Ahrens, P. König und H. Schulz-Hildebrandt, "Dynamic contrast in optical coherence tomography (OCT) Imaging," in *Biophotonics Congress: Biomedical Optics* (2022), [invited].
2. M. Münter und T. Kohlfärber, "DOCT," in *Oberseminar - Institut für Biomedizinische Optik, Universität zu Lübeck* (2021).
3. L. Steinbach, H. Schulz-Hildebrandt, M. Ahrens, M. Münter, G. Hüttmann, P. König, und M. Pieper, "Laser-based marking of human lung tissue to facilitate correlation of 3D-mOCT imaging with classical histology," in *ARCN meeting* (2020).
4. H. Schulz-Hildebrandt, M. Münter, M. vom Endt, M. Pieper, M. Casper, M. Ahrens, T. Kohlfärber, R. Rahmzadeh, P. König, und G. Hüttmann, "Towards optical biopsy by dynamic contrast microscopic OCT," in *Bio-Medical Optics EOSAM* (2020), [invited].
5. G. Hüttmann, M. Münter, T. Kohlfärber, M. Ahrens, M. Pieper, P. König, D. Hillmann und H. Schulz-Hildebrandt, „Microscopic OCT for optical biopsy,“ in *Precision Medicine in Chronic Inflammation Treffen* (2020).
6. M. Münter, M. Pieper, M. vom Endt, P. König, G. Hüttmann, H. Schulz-Hildebrandt "Microscopic optical coherence tomography - 4D imaging of mucus transport," in

Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXIV (2020).

7. M. Münter, M. vom Endt, G. Hüttmann, H. Schulz-Hildebrandt, "Dynamic contrast in scanning mOCT," in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXIV* (2020).
8. M. Münter, "Optical Histology," in *Celltom Projekttreffen*, (2020).
9. M. Münter, "Optical Biopsy," in *Celltom Projekttreffen* (2019).
10. M. Münter, "CellTom," in *Interreg Projekttreffen* (2018).
11. M. Münter, "Innovative optische Bildgebung," in *MetaNook* (2018).
12. M. Münter, „Reconstruction in photoacoustic tomography,“ in *AMMODIT* (2016).
13. M. Münter, "Photoakustische Tomographie," in *Oberseminar - Institut für Biomedizinische Optik, Universität zu Lübeck* (2016).
14. M. Münter, J. Horstmann, C. Buj, B. Schmarbeck, R. Brinkmann, "Resolution and contrast of an optical full-field holographic system for fast non-contact photoacoustic tomography," in *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2016* (2016).
15. M. Münter, C. Buj, J. Horstmann, R. Brinkmann, "Kontaktlose Photoakustische Tomographie," in *Uni im Dialog* (2015).