

Forschungsergebnisse

Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

Zell- und Gewebediagnose mittels Streulichtmikroskopie

Im Rahmen des Forschungsprogramms Optische Technologien der Baden-Württemberg Stiftung wurde in einem Gemeinschaftsprojekt die Zell- und Gewebediagnose mittels Streulichtmikroskopie untersucht.

Das Verständnis der Funktion biologischer Zellen als Grundeinheit aller lebenden Organismen ist essenziell für den wissenschaftlichen Fortschritt in den Lebenswissenschaften. Deshalb ist es wichtig, über Werkzeuge zur Vermessung von Zellen und zellulärer Organellen auf Submikrometerskala zu verfügen, die diese nicht schädigen und ihre Funktion nicht durch externe Marker verändern. Deshalb werden weltweit Modifikationen von Lichtmikroskopen untersucht, die aber ohne das Einbringen von externen Markern (z.B. Fluorophore) meist keinen hinreichenden Kontrast aufweisen.

Durch das in dem Projekt entwickelte Verfahren kann mittels Messung des spektral und winkelaufgelösten Streulichts die Auflösung von definierten Streuern wesentlich verbessert werden. So können prinzipiell zelluläre Strukturen optisch erkannt und hinsichtlich bekannter Krankheitsbilder mit geeigneten Auswerteverfahren analysiert werden. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist, dass keine externen Marker verwendet werden müssen, da die Lichtstreuung selbst Ursprung des Kontrasts ist.

Im Rahmen des Projekts wurde ein Streulichtmikroskop aufgebaut und optimiert. Neben spektral und winkelaufgelösten Messungen wurde auch eine Erweiterung auf polarisationsabhängige Experimente realisiert. Dadurch können aufwendige Referenzmessungen umgangen werden.

Der Messaufbau wurde mithilfe von Polystyrolkugeln evaluiert. Dazu wurden über 100 Polystyrolkugeln

spektral vermessen und mit einem weiteren Aufbau, der kollimierten Transmissionsmethode, verglichen. Die gemittelten Durchmesser der Polystyrolkugeln wurden auf unter einen Nanometer genau bestimmt, also mehr als einen Faktor 1000 genauer als der absolute Durchmesser, der einige Mikrometer betrug, siehe Abbildung 1.

Des Weiteren wurde eine große Anzahl zwei- und dreidimensionaler Modelle auf Unterschiede des Remissions- und Transmissionsverhaltens untersucht, die jeweils einerseits mit Lösungen der exakten Maxwell-Gleichungen und andererseits mit Lösungen der Transportgleichung berechnet wurden. Mit diesen theoretischen Betrachtungen lässt sich die Gültigkeit der seither verwendeten Auswertelgorithmen abschätzen.

Es konnte gezeigt werden, dass für kleine Streuer (im Vergleich zur Lichtwellenlänge) abhängige Streuung schon für kleine Konzentrationen vorliegt, d.h. dass hier die seither in der Regel angenommene unabhängige Streuung nicht verwendet werden kann. Bei größeren Streuern tritt die

abhängige Streuung dagegen erst bei größeren Konzentrationen auf.

Somit besteht die Möglichkeit, dass z.B. Bakterien aufgrund der Streulichtmessungen nicht nur erkannt werden, sondern ihre genaue Größe durch Vergleich mit den Simulationen ermittelt werden kann.

Messungen an Zellkernen dagegen zeigten Streuspektren, die ohne theoretische Betrachtungen selbst qualitativ nicht erklärbar waren, siehe Abbildung 2. Genauere aufwendige Simulationen, die ohne die Hardware-Beschleunigung der Streulicht-Simulation aus Rechenzeit-Gründen nicht durchführbar gewesen wären, ermöglichten dann die Interpretation der Spektren als Überlagerung der Spektren des Zellkerns und dessen Mikrostruktur, insbesondere der Nukleoli.

Für die Hardware-beschleunigte Streulichtsimulation wurden zwei algorithmische Ansätze auf Basis der Maxwell-Gleichungen verfolgt, die diskrete Dipol-Approximation (DDA) und die Finite-Difference-Time-Domain-Methode (FDTD). Die sequentielle DDA ist für

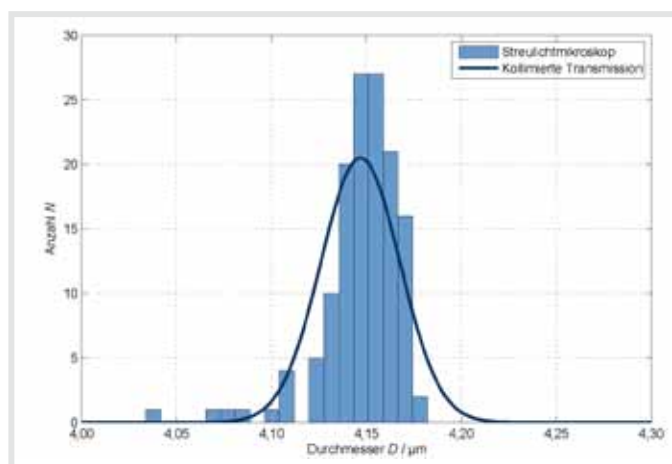


Abbildung 1: Histogramm der 137 Kugeldurchmesser, die einzeln mit Hilfe der spektral aufgelösten Streulichtmikroskopie bestimmt wurden (Mittelwert $v_{SM} = 4,1471 \mu\text{m}$ und Standardabweichung $\sigma_{SM} = 0,0206 \mu\text{m}$). Die dunkelblaue Linie repräsentiert die Gauß'sche Größenverteilung der Polystyrol-Kugel-Suspension, die mit dem Aufbau der kollimierten Transmission bestimmt wurde (Mittelwert $v_{CT} = 4,1468 \mu\text{m}$ und Standardabweichung $\sigma_{CT} = 0,0208 \mu\text{m}$).

geringe Brechungsindizes gegenüber einer sequentiellen FDTD-Methode auf einer CPU hinsichtlich der Rechenzeit vorteilhafter. Die DDA konnte für eine Grafikkarte parallelisiert und damit um bis zu einem Faktor 15 beschleunigt werden.

Die FDTD-Methode skaliert verglichen dazu wesentlich besser auf paralleler Hardware, da lediglich lokale Datenabhängigkeiten zwischen den elektromagnetischen Feldvariablen der Grid-Zellen existieren. Für die DDA wird das Material stattdessen in Dipole diskretisiert, deren Wechselwirkungen in dem Simulationsalgorithmus zu globalen Datenabhängigkeiten führen und damit den Geschwindigkeitsgewinn auf einer Grafikkarte begrenzen.

Im Gegensatz dazu konnte für die FDTD-Methode für die parallelisierten Implementierungen auf einer Grafikkarte eine Beschleunigung um den Faktor 100 bis 200 erreicht werden. Somit wird z.B. für eine Menge an 3D-Simulationen, die die Rechenzeit von ca. einer Woche auf einer CPU benötigen, diese auf einer Grafikkarte mit der erarbeiteten Implementierung in 1 bis 2 Stunden berechnet. Insofern konnte gezeigt werden, dass für parallele Implementierungen mit der FDTD deutlich bessere Ergebnisse gegenüber der DDA erreicht werden können.

Mit der parallelen FDTD-Implementierung konnten wesentlich umfangreichere Simulationen durchgeführt und Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen gezogen werden. Für die parallele FDTD-Implementierung wurden alle Schritte einschließlich der

Feldberechnung, der Berechnung des Perfectly Matched Layer, dem Total-Field/Scattered-Field-Verfahren und dem Near-To-Farfield-Verfahren auf die GPU übertragen (siehe Abbildung 3).

Eine Einschränkung, die Grafikkarten prinzipiell mit sich bringen, ist der auf wenige GByte begrenzte Speicher, der für die FDTD die Größe des maximal möglichen Simulationsgebiets bestimmt.

Um das Simulationsgebiet unabhängig von der Speichergröße zu realisieren, wurde es in Bereiche zerlegt, die eigenständig auf einer Grafikkarte berechnet werden können. An den Rändern der Bereiche entsteht ein zusätzlicher Kommunikationsaufwand, so dass insgesamt durch das Gebietszerlegungsverfahren die Performance der parallelen FDTD reduziert wird. Diese Performance-Reduktion konnte jedoch durch geeignete Maßnahmen auf lediglich ca. 25% begrenzt werden.

Mit dieser FDTD-Implementierung steht nun ein Werkzeug für die rechenzeiteffiziente Durchführung von komplexen Streulichtsimulationen zur Verfügung, das intensiv für die Arbeiten in diesem Projekt eingesetzt wurde und darüber hinaus für zukünftige Projekte auch anderen Anwendern zur Verfügung steht.

Für ein Online-Analyse-Werkzeug wurden Arbeiten durchgeführt, die sich aus zwei Gründen auf Untersuchungen am Zellkern konzentriert haben. Zum einen ist die Größe, Form und die Homogenität des Zellkerns eines der Hauptmerkmale für die Be-

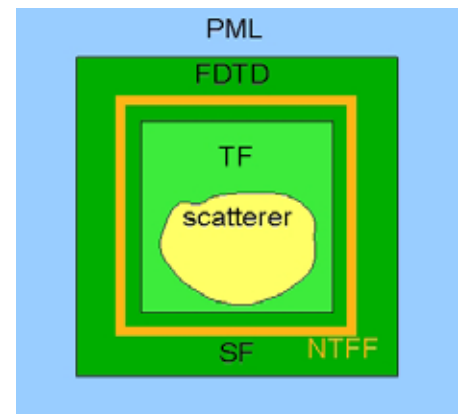


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der FDTD, PML = Perfectly Matched Layer, TF = Total Field, SF = Scattered Field, NTFF = Near-To-Farfield.

stimmung von Gewebeentartungen, zum anderen hätten Simulationen von größeren Geometrien (z.B. Zellen) die verfügbaren Rechenzeiten gesprengt.

Diese Untersuchungen zeigen einerseits das Potenzial der Streulichtmikroskopie für die Krebsfrüherkennung, demonstrieren aber auch andererseits eindrucksvoll die Notwendigkeit der theoretischen Beschreibung der Spektren.

Kontakt

Prof. Dr. Alwin Kienle

Institut für Lasertechnologien
in der Medizin und Meßtechnik
an der Universität Ulm

Helmholtzstr.12
89081 Ulm

Tel. 0731 1429224

alwin.kienle@ilm.uni-ulm.de
www.ilm-ulm.de

Prof. Dr. Sven Simon

Institut für Parallele und Verteilte
Systeme, Universität Stuttgart

Universitätsstr. 38
70569 Stuttgart

Tel. 0711 685-8450

sven.simon@ipvs.uni-stuttgart.de
www.ipvs.uni-stuttgart.de

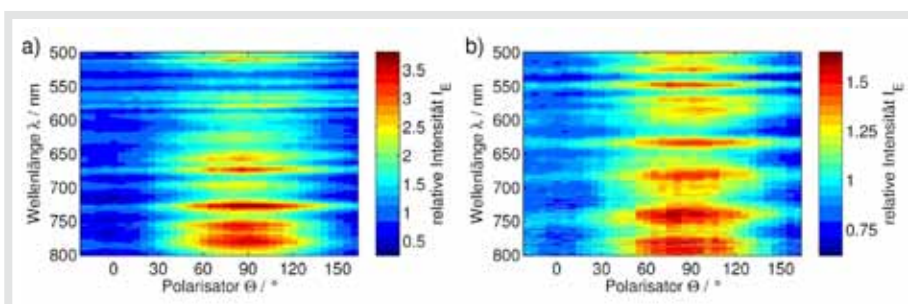


Abbildung 2: Polarisationsabhängige Streuspektren von Zellkernen: a) CHO-Kern. b) 3T3-Kern.