

Eingebettete Systeme in hochautomatisierten Forschungsmikroskopen

Dr. Ing. Lukas Jung

19.06.2023



From Eye to Insight

1

Leica Microsystems

2

Floureszenz Mikroskopie

3

Konfokale Mikroskopie

4

Fragen

Leica Microsystems

- Leica Microsystems entwickelt Mikroskope und bildgebende Systeme für Bildgebung und Analyse von Makro-, Mikro- und Nanostrukturen.
- Weltweit ca. 3000 Mitarbeiter
- Standorte in
 - Wetzlar
 - Mannheim
 - Heerbrug
 - Wien
 - Singapur
 - Shanghai



Leica Microsystems - Produkte

- Lichtmikroskopie
- Konfokalmikroskopie
- Operationsmikroskope



Leica Microsystems – Anwendungen (Auswahl)

- Biowissenschaften
- Medizintechnik
- Halbleiteindustrie
- Metall und Maschinenbau
- ...



Leica Microsystems - Überblick

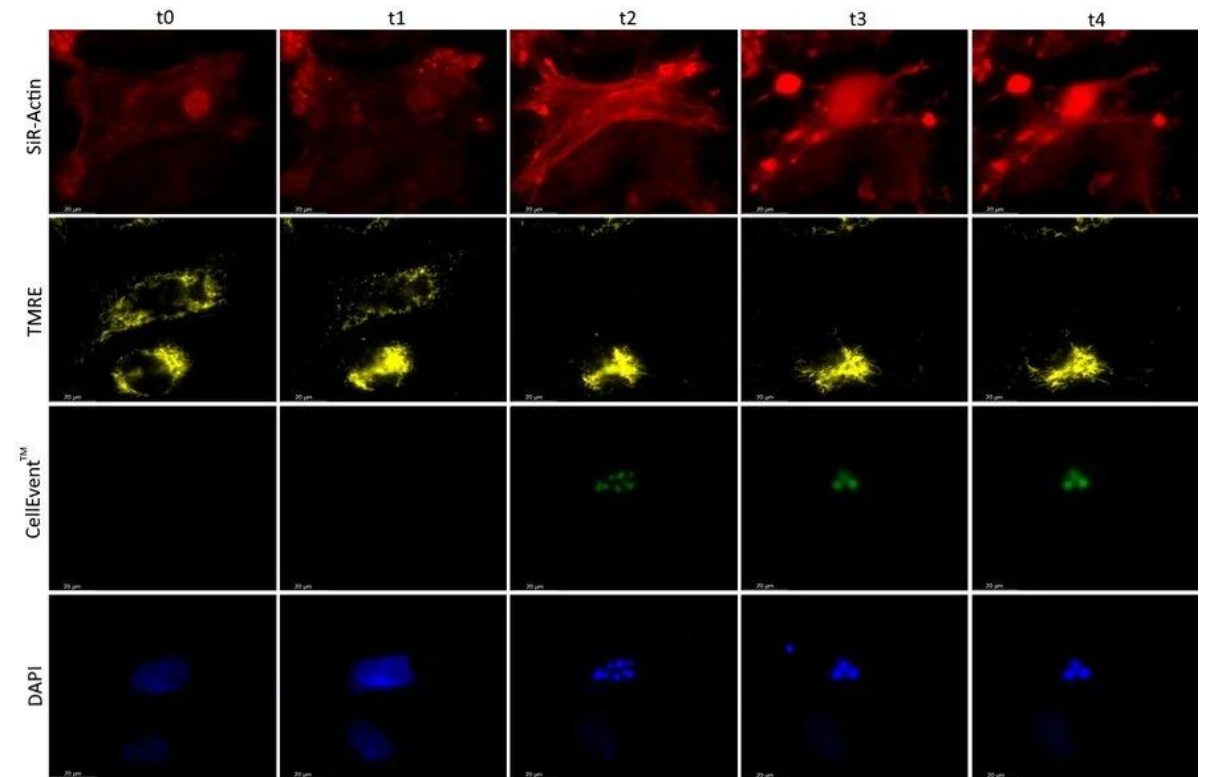
- Konstruktion (Mechanik)
- Optik
- Elektronik
 - PCBs
 - FPGAs
 - SoCs
 - ...
- Software
 - Firmware
 - Datenmanagement
 - GUI
 - KI Anwendungen
 - ...



Große Herausforderungen bei der Entwicklung

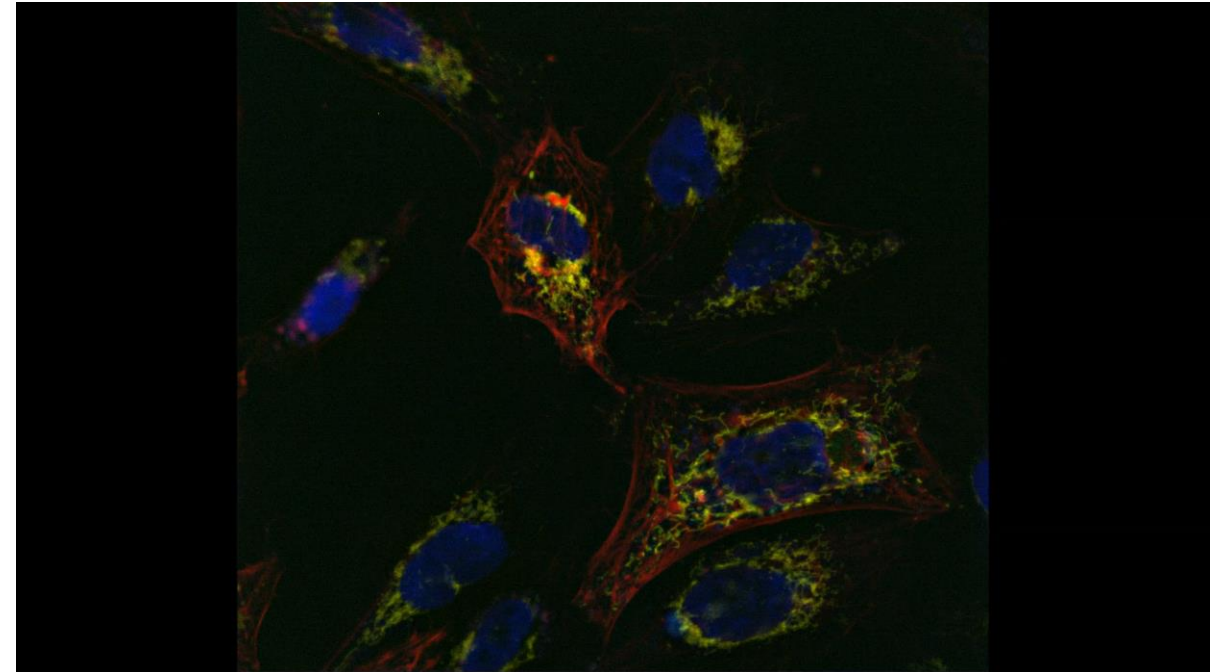
Fluoreszenzmikroskopie

- Herkömmliche Mikroskopie
 - Probe wird beleuchtet
 - Reflektiertes Licht wird gemessen
- Fluoreszenzmikroskopie
 - Biologische Probe (tot oder lebendig)
 - Probe wird mit fluoreszierenden Farbstoffen versehen (Bio-Marker). Bsp.:
 - SiR-Actin – Zellwände
 - TMRE – Mitochondrien
 - CellEvent – bestimmte Enzyme
 - DAPI – Zellkernen



Fluoreszenzmikroskopie

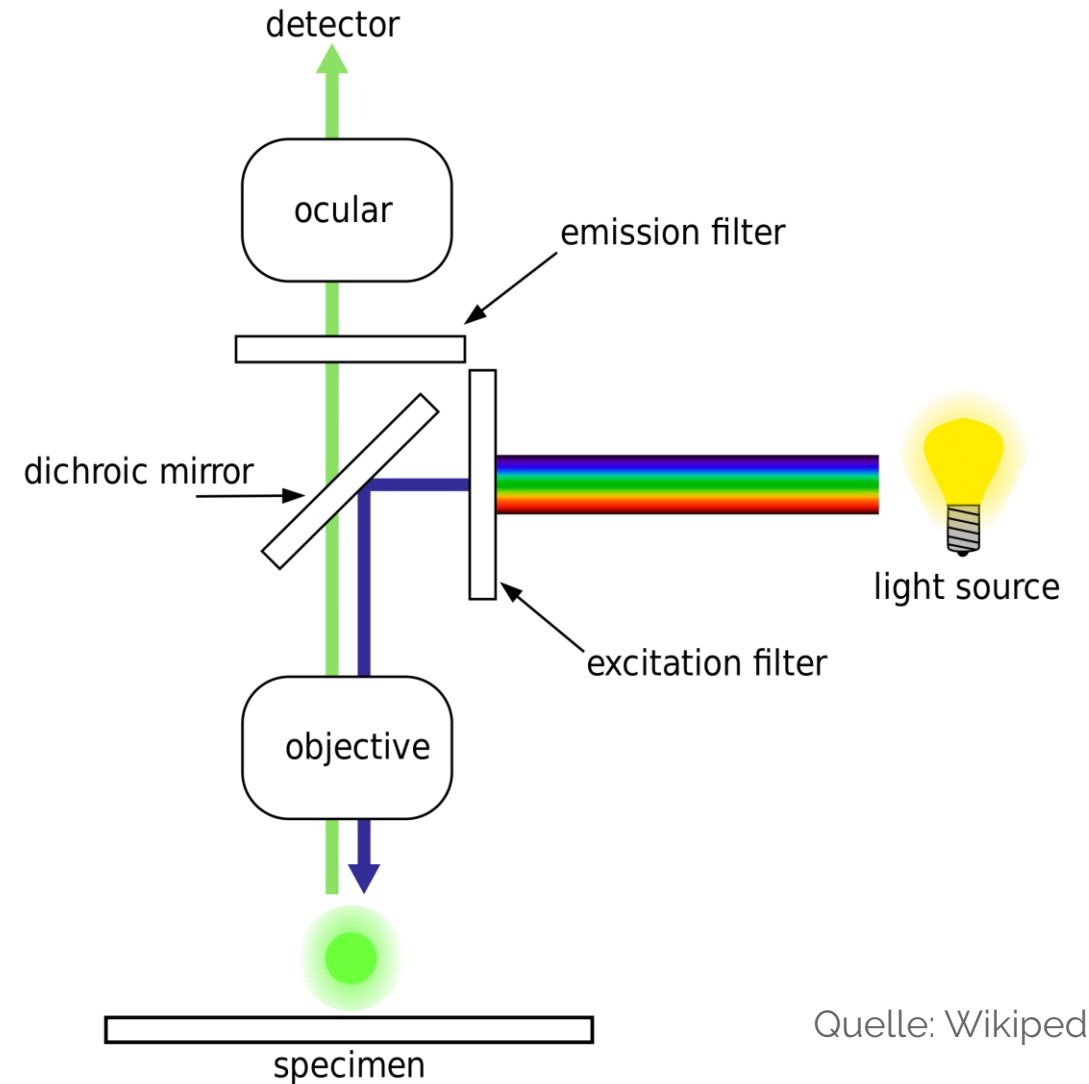
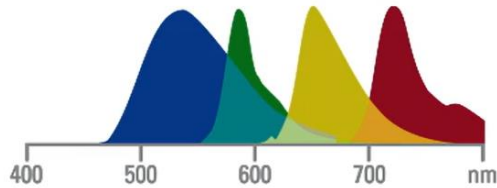
- Herkömmliche Mikroskopie
 - Probe wird beleuchtet
 - Reflektiertes Licht wird gemessen
- Fluoreszenzmikroskopie
 - Biologische Probe (tot oder lebendig)
 - Probe wird mit fluoreszierenden Farbstoffen versehen (Bio-Marker). Bsp.:
 - SiR-Actin – Zellwände
 - TMRE – Mitochondrien
 - CellEvent – bestimmte Enzyme
 - DAPI – Zellkernen



<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/simplifying-complex-fluorescence-multiwell-plate-assays/>

Fluoreszenzmikroskopie

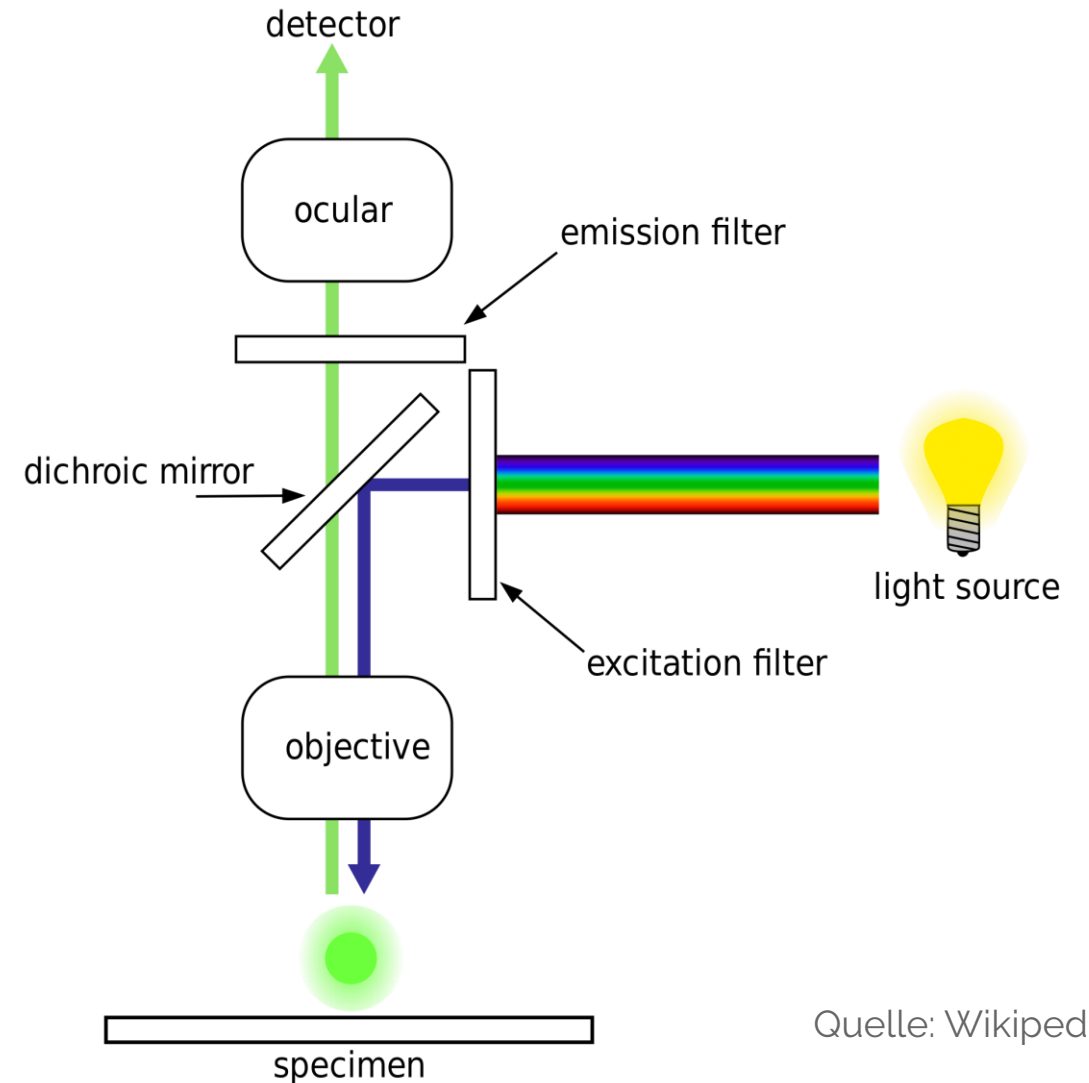
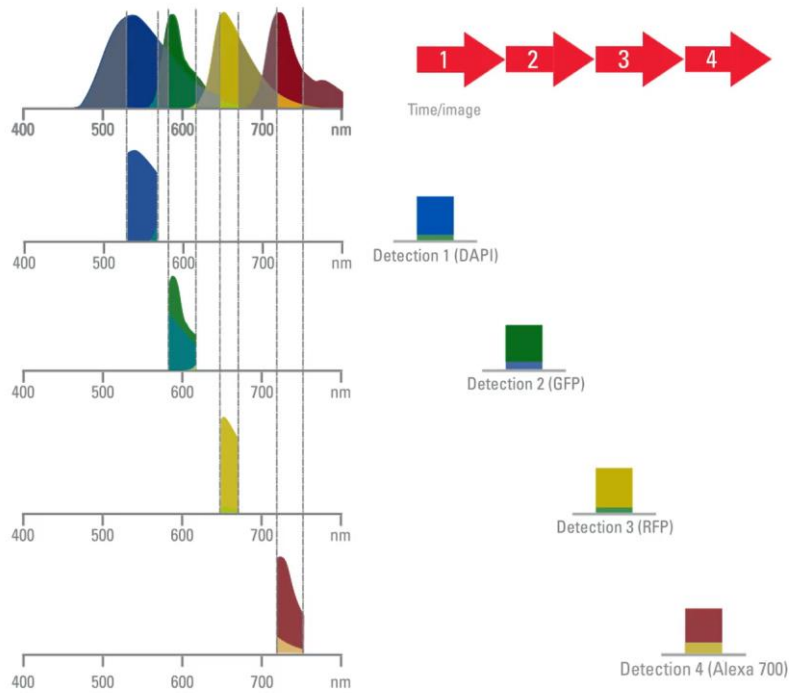
- Problem:
Anregungs- und Emissionsspektren überlappen



Quelle: Wikipedia

Fluoreszenzmikroskopie

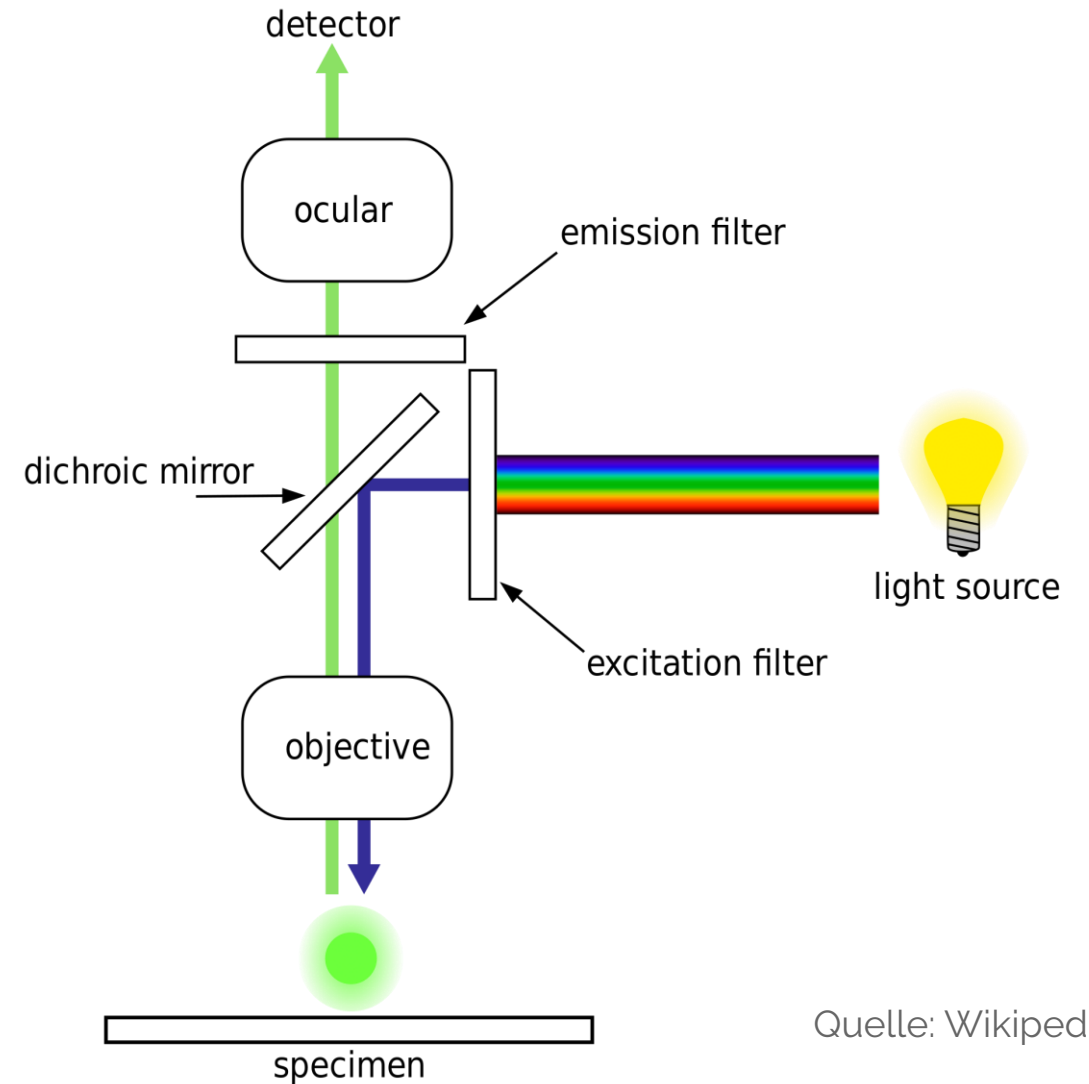
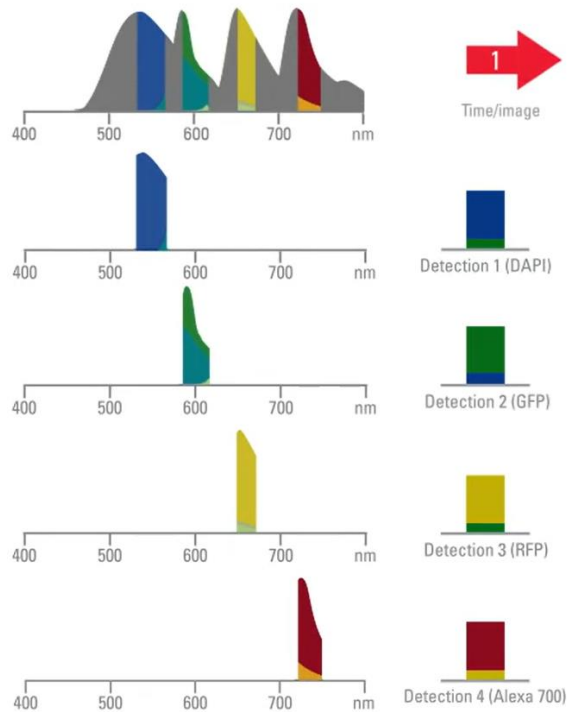
- Naiver Ansatz:
 - Aufnahme von mehreren Bildern nacheinander mit passendem optischen Filter
 - Niedrige Framerate und leichter Crosstalk



Quelle: Wikipedia

Fluoreszenzmikroskopie

- Parallele Aufzeichnung:
 - Aufnahme von mehreren Bildern gleichzeitig mit optischen Multiband-Filter
 - Höhere Framerate aber mehr Crosstalk

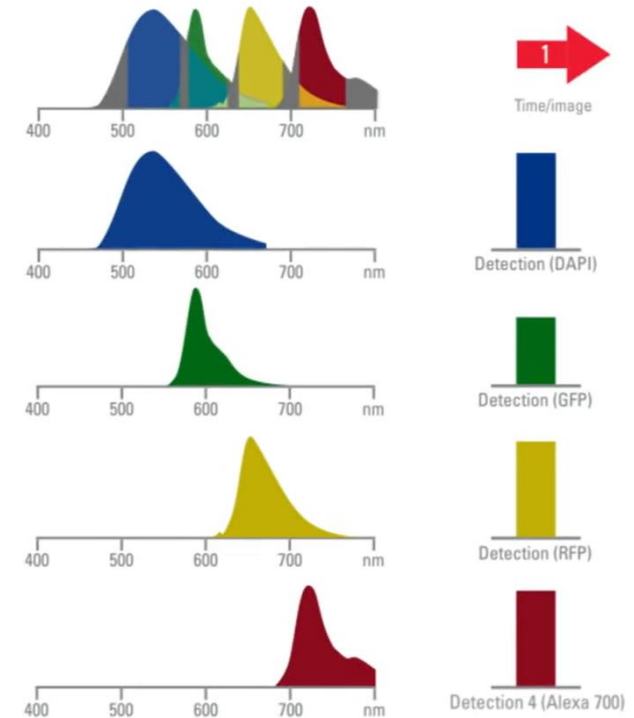


Quelle: Wikipedia

Fluoreszenzmikroskopie

- FluoSync

- Aufnahme von mehreren Bildern bei genauer Kenntnis von:
 - Emissionsspektrum der Lichtquelle(n)
 - Anregungsspektrum der Farbstoffe
 - Emissionsspektrum der Farbstoffe
 - Detektionsspektrum
 - Optische Eigenschaften des Gesamtsystems (für jeden Pixel)
- Mathematische Entmischung der verschiedenen Spektren
 - Hohe Framerate, kein Crosstalk
 - Hoher Rechenaufwand nötig



Fluoreszenzmikroskopie

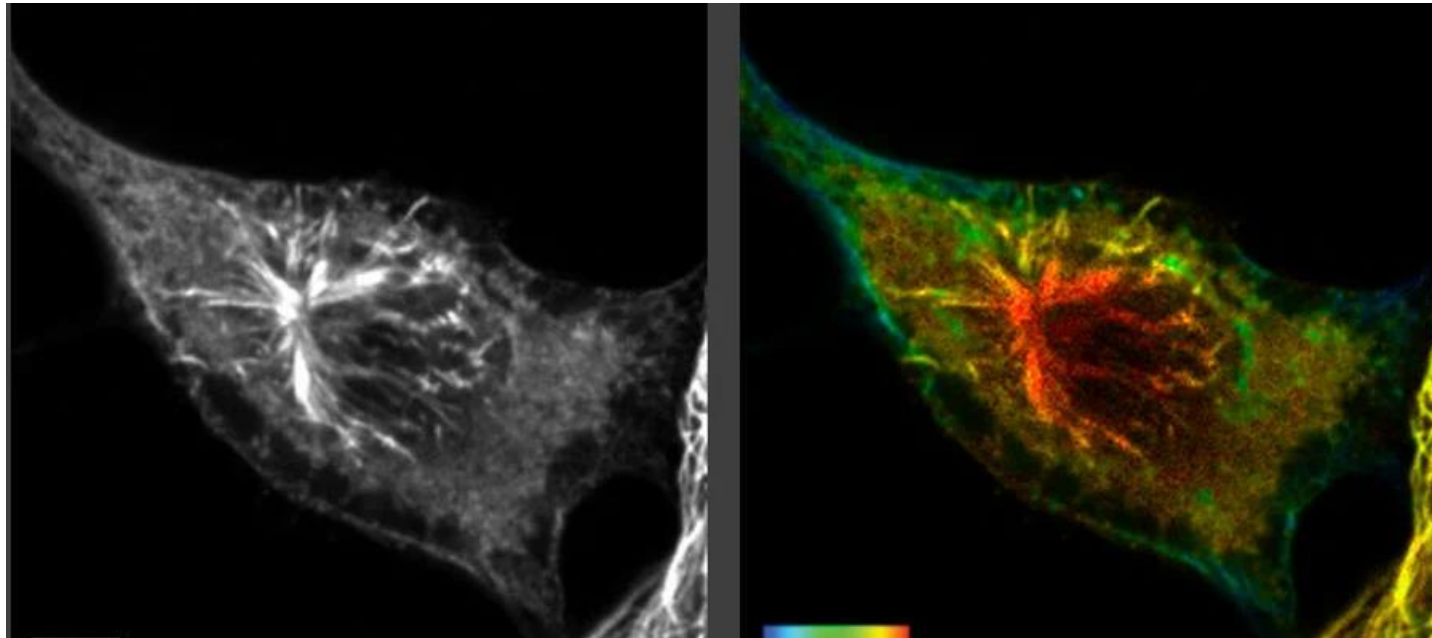
- <https://www.youtube.com/watch?v=Pu5irHau5do>

Fluoreszenzmikroskopie – Technische Herausforderungen

- In der Praxis:
 - Es können nicht beliebig viele Farbstoffe gleichzeitig aufgenommen werden
 - Wiederholung von FluoSync mit verschiedenen Anregungen & Filtern
- Fiktives Bsp.:
 - Vier 25MPixel Sensoren (16 Bit Grauwert)
 - Vier Beleuchtungs/Filter Einstellungen
 - $4 * 4 * 25\text{MPixel} * 2 \text{ Bytes/Pixel} = 800\text{MB}$
 - Field of View: 2mm x 2mm
 - Probengröße: 2cm x 2cm
 - 100 Bilder -> 80 GB Daten
- Eingebetteter Imager muss:
 - YX position einstellen (100x)
 - Belichtung und Filter einstellen (4x)
 - 4 Bilder aufnehmen
 - Pixel Korrektur?
 - Objektivkorrektur?
 - Spektral Entmischen
 - Stitching?

Fluoreszenzmikroskopie – FLIM

- Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
 - Messung der Fluoreszenzlebensdauer
 - Lebensdauer hängt von Farbstoff und chemischen Eigenschaften der Umgebung ab
 - Messreihe pro XY Position und Beleuchtungs-/Filtereinstellung
 - Bsp.: 10 Messpunkte -> 800GB Daten



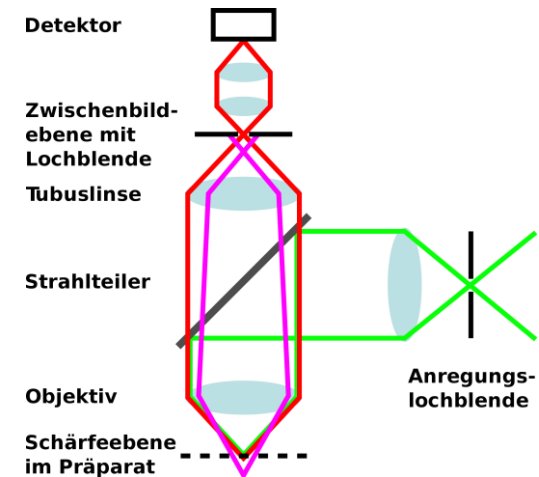
Fluoreszenzmikroskopie – FLIM

- 100 Positionen, 4 Beleuchtungs/Filter Einstellungen, 10 Messpunkte
 - 4000 Frames -> bei 10 FPS
 - 400 Sekunden = ca. 6 Minuten
 - 800 GB Daten
- Hohe Anforderungen an das Eingebettete System:
 - Genauer Zeitlicher Ablauf (RT)
(Filter-/Belichtungseinstellung synchron zur Bildaufnahme)
 - Schnelle Datenübertragung
 - Hohe Rechenleistung
- Beschleunigung durch GPUs/FPGAs
- Zusätzlich KI Unterstützung bei der Erkennung von Zellbestandteilen / kranken Zellen o.ä.

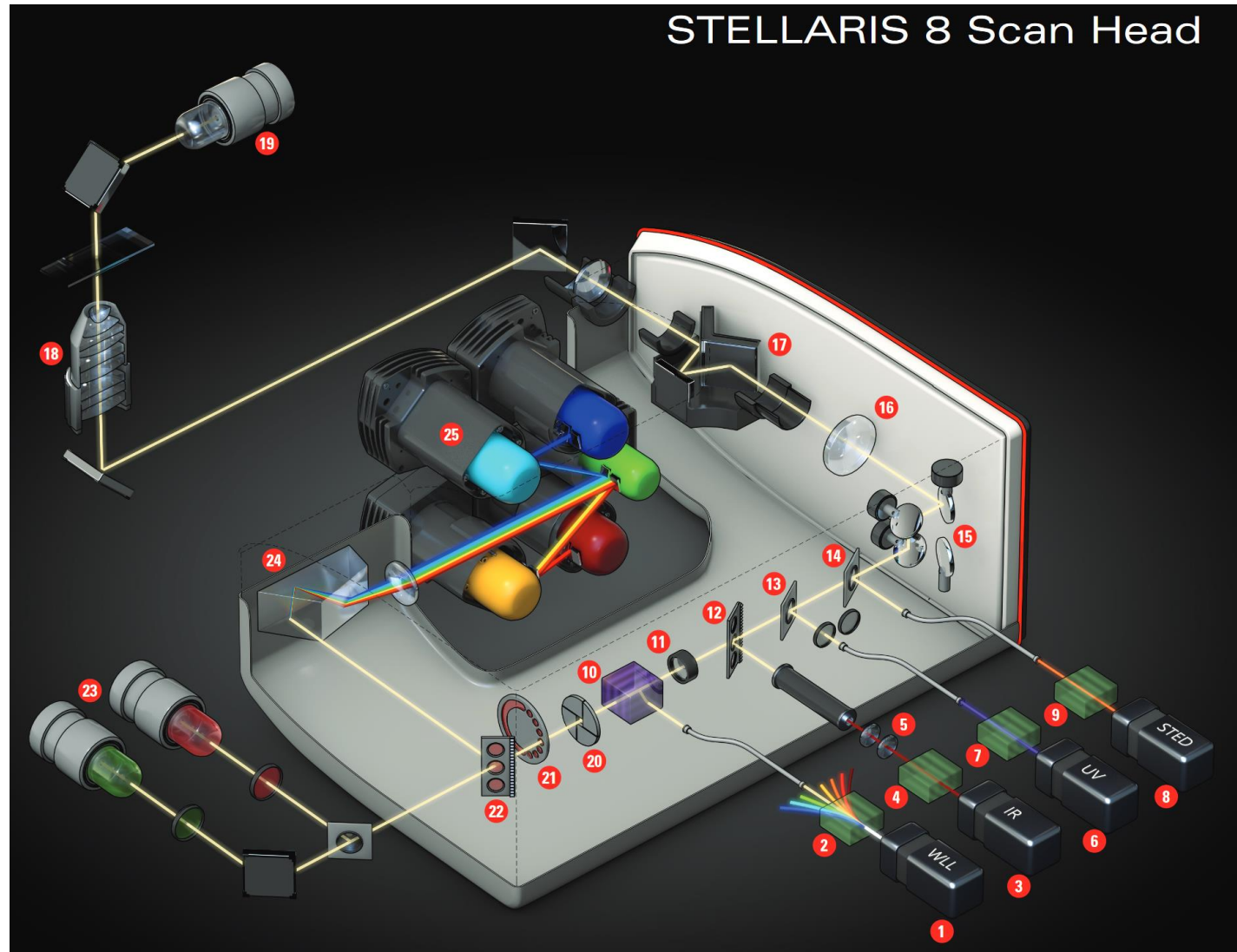
-> Sehr starke Anforderungen an Hardware und Software

Konfokalmikroskopie

- Herkömmliche Mikroskopie
 - Beleuchtung und Aufzeichnung der gesamten Probe gleichzeitig
- Konfokalmikroskopie
 - Beleuchtung eines einzelnen Punktes (XY Richtung) der Probe
 - Blende blockiert Strahlen außerhalb des Fokusbereichs (in Z-Richtung)
 - > Genauere Auflösung
 - > Erzeugung von 3D Bildern möglich
- Detektor nimmt immer nur ein Pixel auf -> Scanner

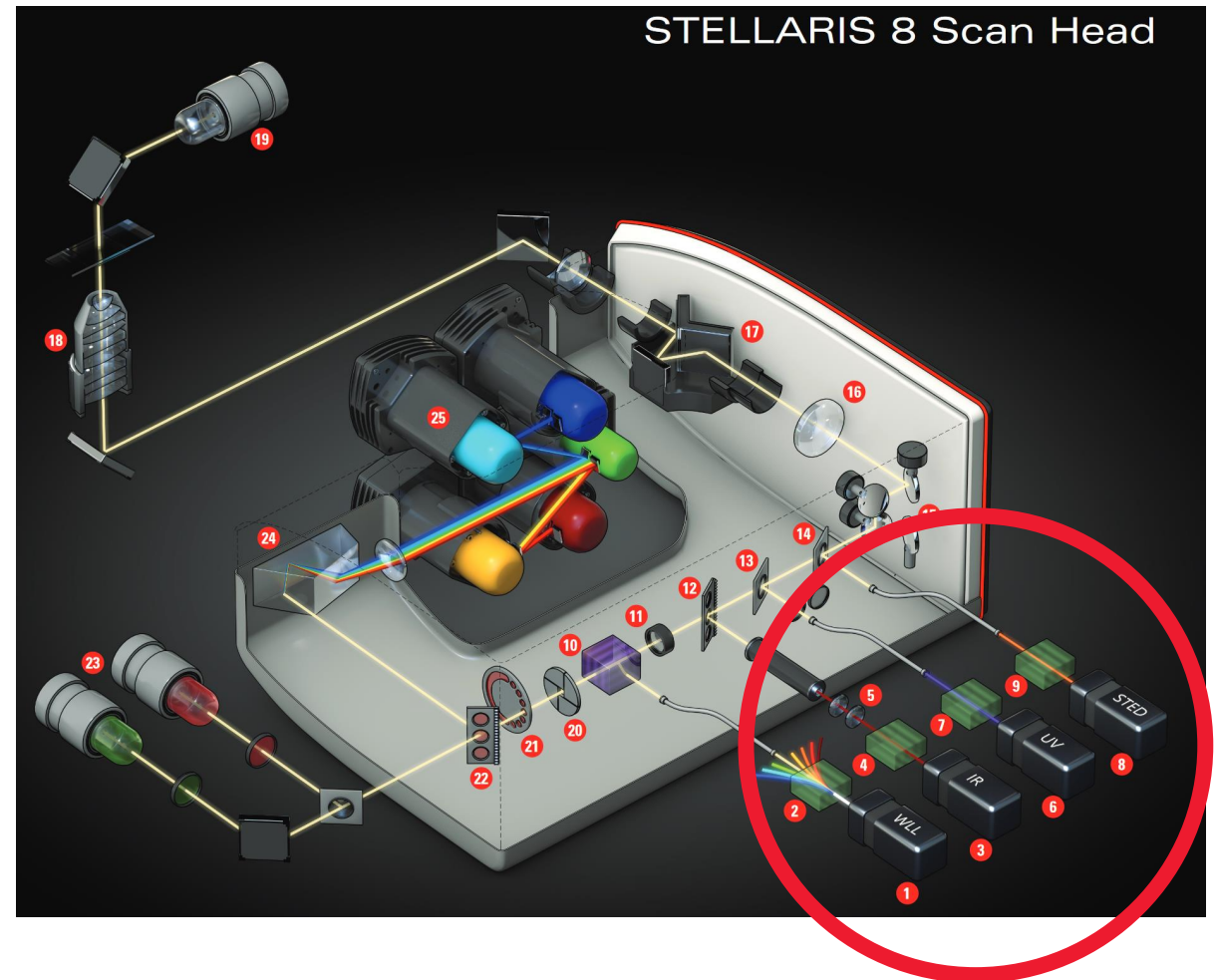


Konfokalmikroskopie



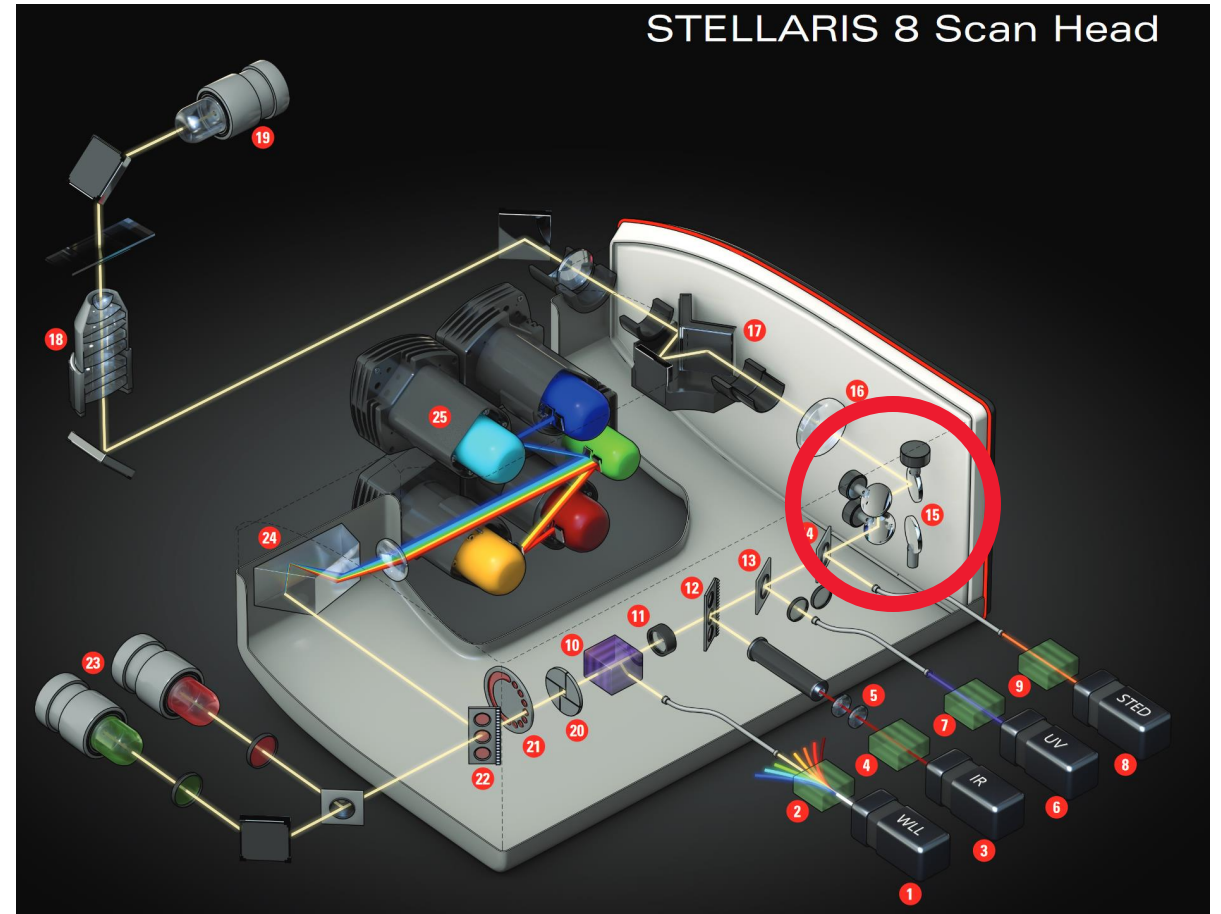
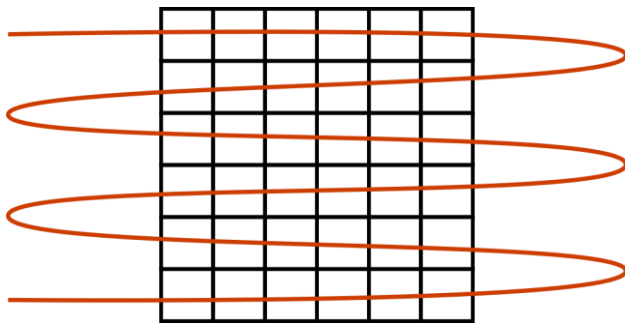
Konfokalmikroskopie - Anregungslaser

- Anregung mit verschiedenen Laser
 - Weißlichtlaser
 - Infrarot
 - UV
 - STED
- Intensitätsregelung über AOTF (Acusto-Optic Tunable Filter)
 - Akustische Schwingung beeinflusst Brechungsindex eines Kristalls



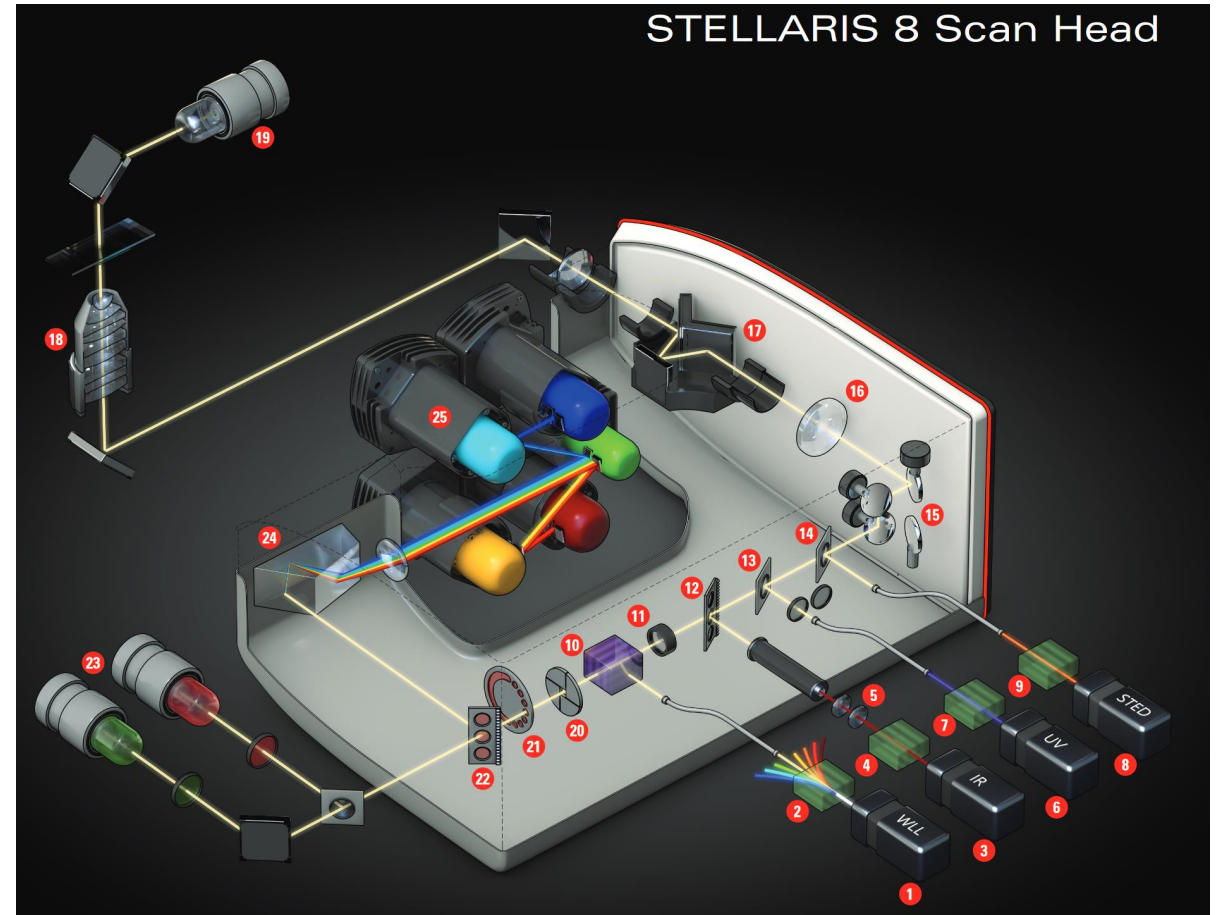
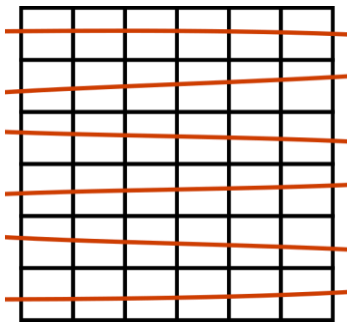
Konfokalmikroskopie - Strahlsteuerung

- Ablenkung durch Spiegel
- Rotation durch Galvanometer
 - Erzeugt Drehbewegung abhängig vom Strom
- Probe wird zeilenweise beleuchtet
- Zeilenfrequenz 600Hz – (Periode = 1,66ms)
 - 0,833ms Pro Zeile
 - 5000 Pixel pro Zeile -> weniger als 166ns pro Pixel
 - 8,33 s pro Bild (25MPixel)



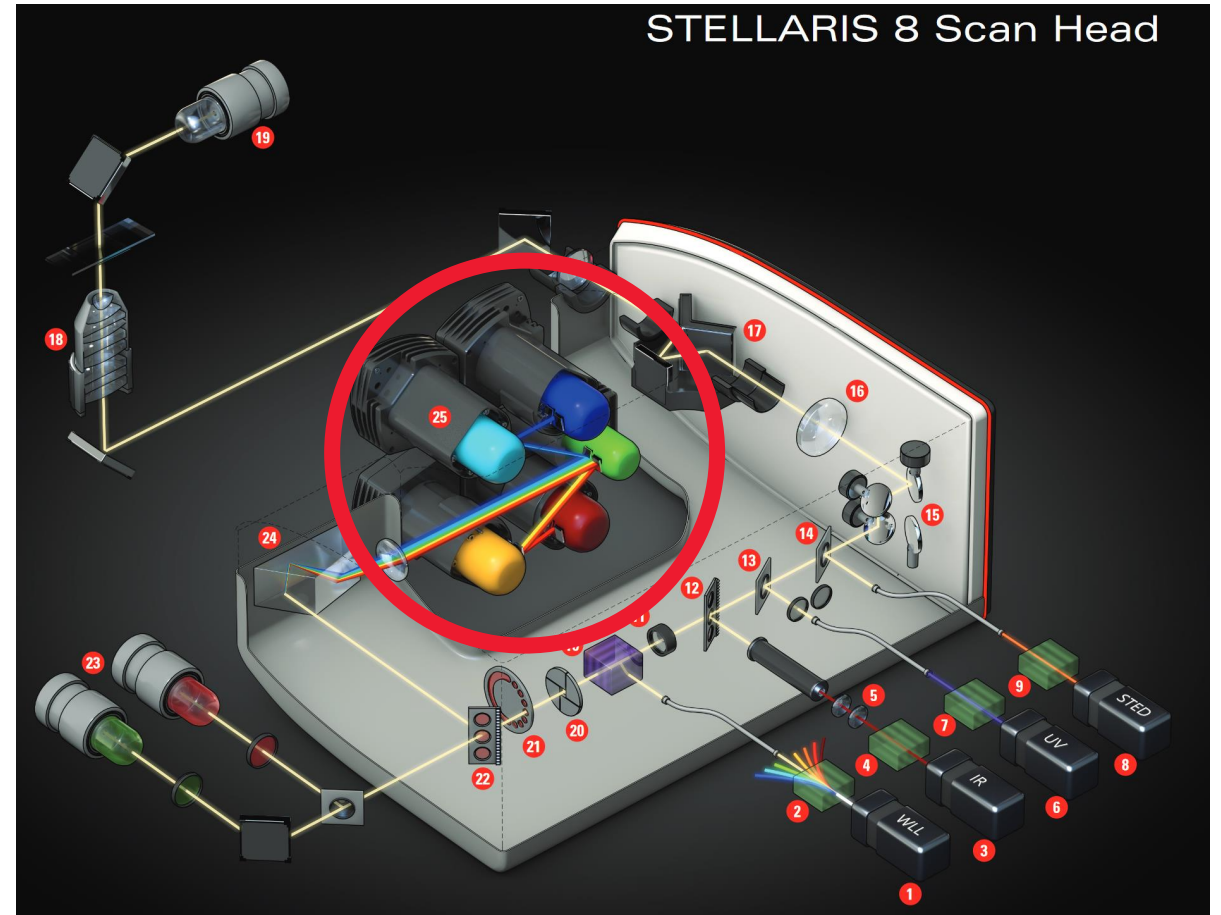
Konfokalmikroskopie - Strahlsteuerung

- Blanking zur Schonung der Probe (über AOTF)



Konfokalmikroskopie – Detektoren

- Ziel: Laserleistung möglichst gering
 - Photonengenaue Detektoren

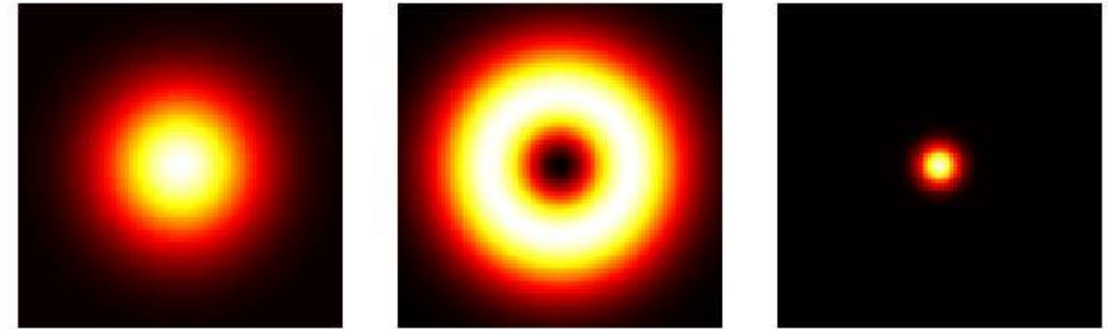


Konfokalmikroskopie – STED

- Stimulated Emission Depletion
 - Maximale Auflösung bei Konfokalen Mikroskopen ist halbe Wellenlänge
 - Violett -> 200nm Auflösung
 - Zweiter, ringförmiger Strahl löscht Anregung aus
 - Auflösung <30 nm (lateral) und <100 nm (axial)

Exakte Steuerung nötig:

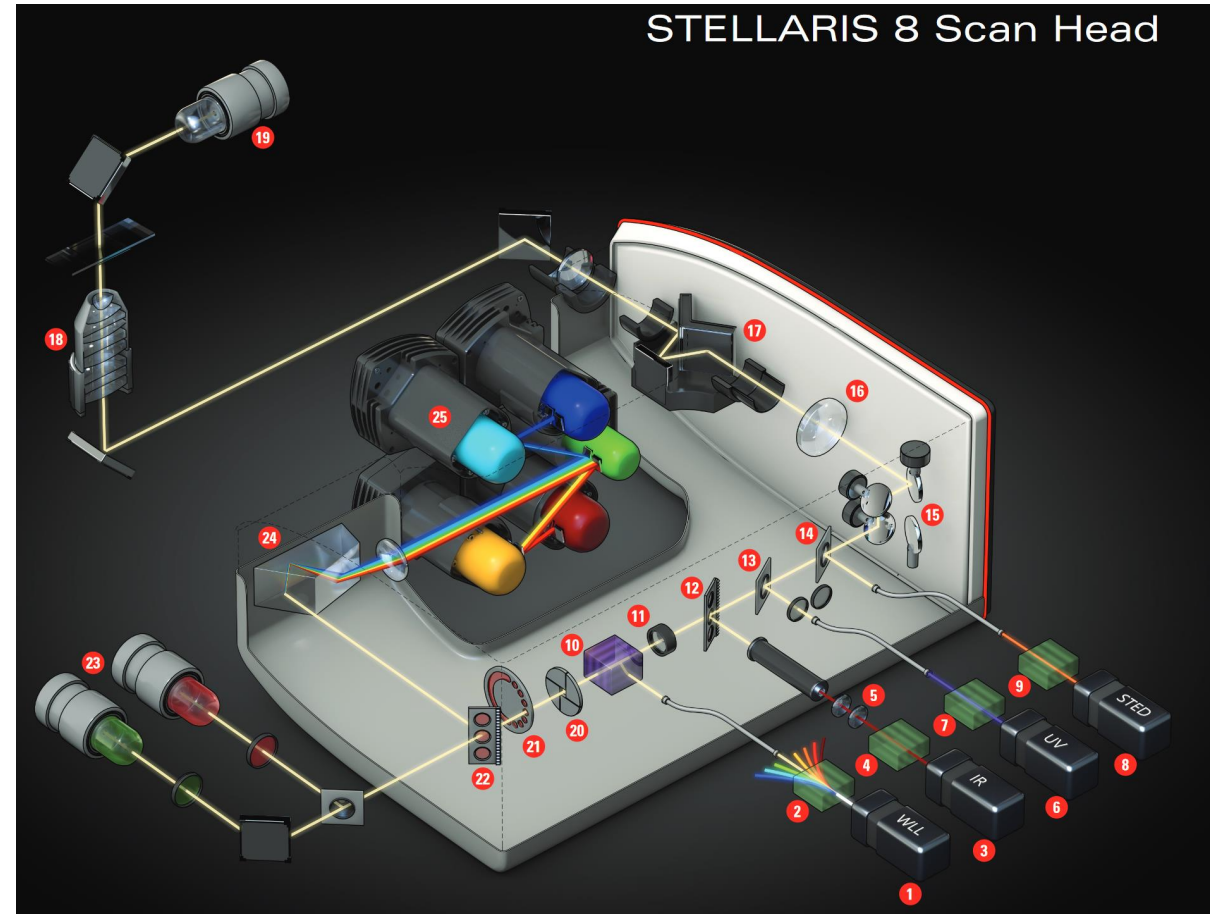
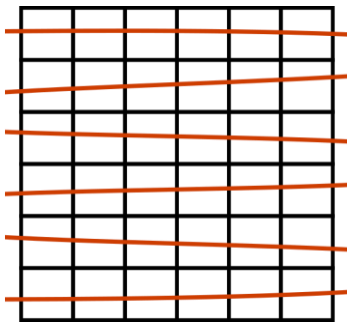
- 10-100ps Abstrand zwischen Anregung und Auslöschung
- Bei der Auswertung wird Zeitlicher Ablauf berücksichtigt (TauSTED)



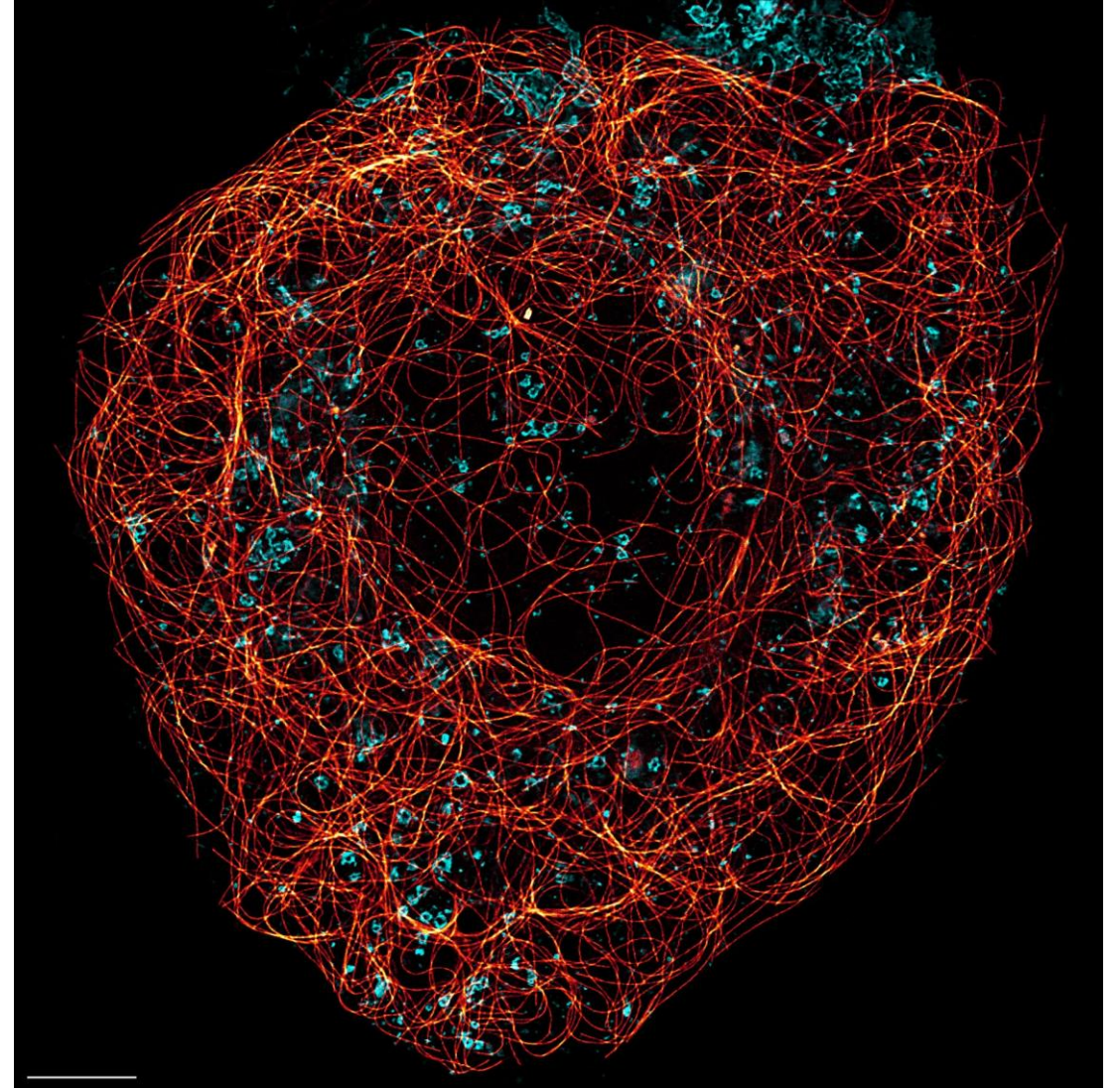
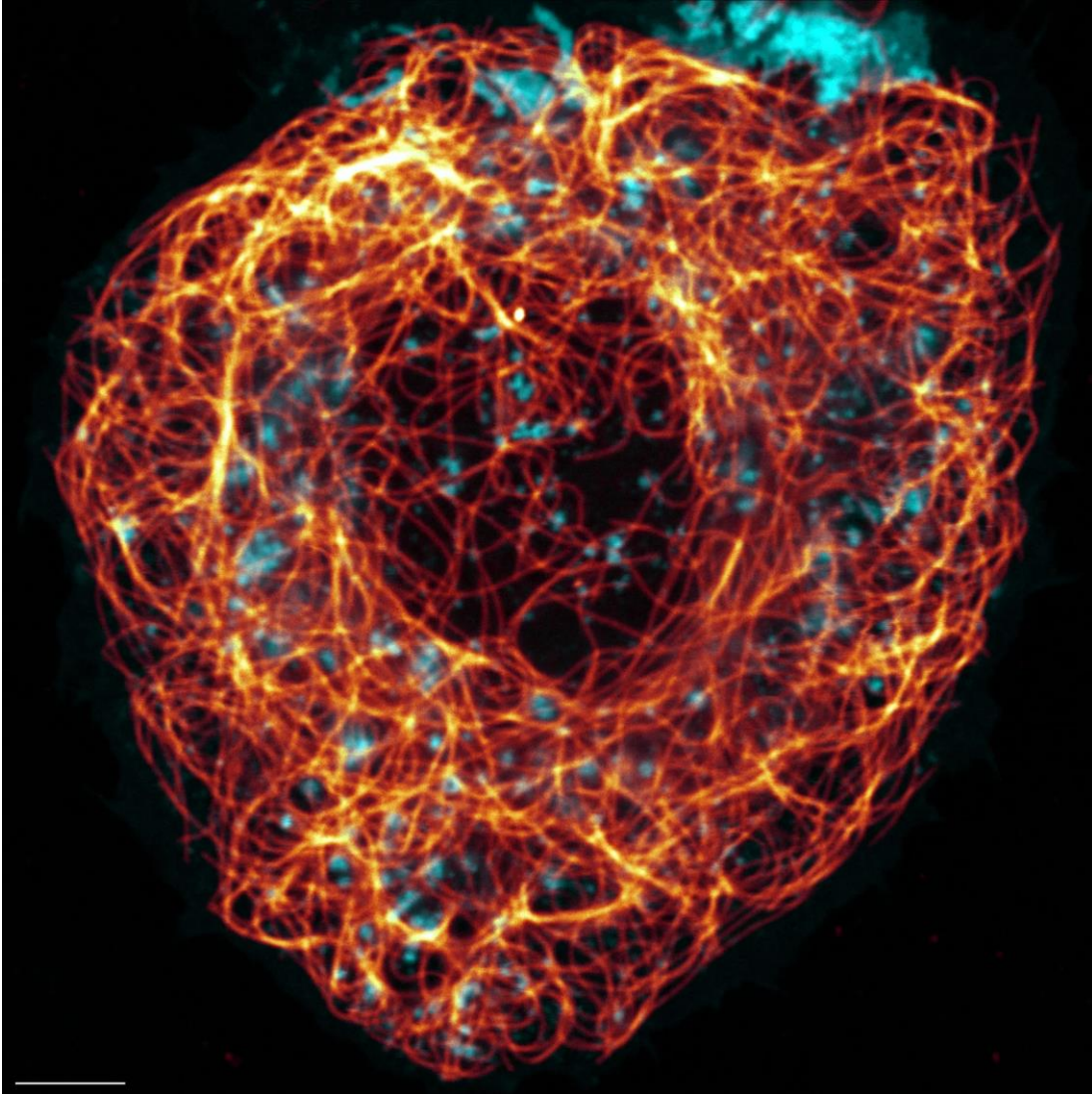
Quelle: Wikipedia

Konfokalmikroskopie – Technische Herausforderungen

- Exakte Synchronisation von
 - Detektor
 - Galvanometer
 - AOTF
 - STED Laser
- Steuerung in HW notwendig
- Enge Verzahnung mit der Software



Konfokalmikroskopie – STED



Ende

Q&A