

## Achsen-Steuerung 2-Photonen Mikroskop

<b>Kunde</b>	Universität Zürich
<b>Verwendung</b>	Gehirnforschung
<b>Bedienung</b>	Elektronisches Handrad, Touchscreen
<b>Technologien</b>	Motion Control von National Instruments, Schrittmotoren, Nanopositioniersystem von PI
<b>Programmiersprache</b>	LabVIEW 2012
<b>Speziell</b>	Wahlweise Bedienung über Touchscreen oder elektronisches Handrad

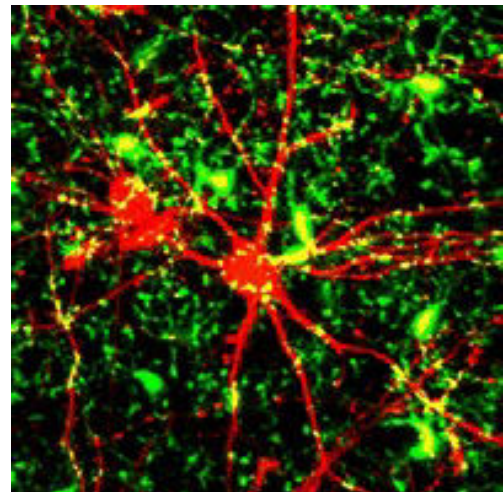


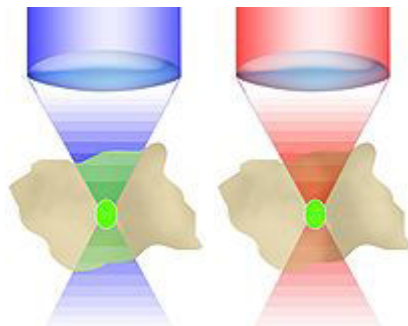
Abb.: In vivo Zwei-Photonen-Mikroskopie-Bild von Neuronen (rot) und Mikroglia (grün).

### Einleitung

Bis vor kurzem ließen sich Gliazellen (Zellen im Nervengewebe) ausschließlich in vitro (Gehirnschnittpräparaten oder in Zellkulturen) untersuchen. Diese Verfahren haben jedoch einen entscheidenden Nachteil: Sie stellen stets einen massiven Eingriff in das natürliche Gefüge des Gehirns dar und erschweren deshalb Rückschlüsse auf das Verhalten der Zellen unter physiologischen Bedingungen. Mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie kann man einen direkten Blick ins lebende Gewebe werfen. Die Zellen lassen sich in vivo beobachten, also unter normalen Verhältnissen im intakten Gehirn. Klassische Lichtmikroskopie-Techniken reichen nur etwa 50 Mikrometer tief in biologisches Gewebe und beschränken sich damit auf die oberflächlichen Strukturen des Gehirns. Anders die Zwei-Photonen-Mikroskopie. Selbst im stark lichtstreuenden Nervengewebe liefert sie aus bis zu einem Millimeter Tiefe hoch-auflösende Bilder. Dort befindet sich bereits die Kortex, die interessanteste Schicht des Gehirns. Sie gilt als der Sitz höherer Hirnfunktionen und beherbergt neben Neuronen auch alle Typen von Gliazellen.

### 2-Photonen Mikroskop

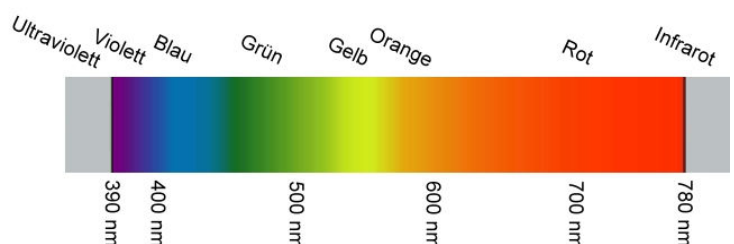
Ein 2-Photonen Mikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop bei dem ein fokussierter Laserstrahl ein Präparat abstrahlt. Mit Hilfe eines starken, fokussierten Laserstrahls werden dabei Elektronen durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen (Lichtteilchen) in einen höheren Energiezustand versetzt. Die Elektronen bleiben für einige Nanosekunden auf dem höheren Energieniveau, bevor sie wieder zurückfallen und dabei ein neues, längerwelliges, energieärmeres Photon aussenden (Fluoreszenz). Dieser optische Effekt funktioniert auch bei der Absorption nur eines Photons; dies aber mit kürzerer Wellenlänge und entsprechend grösserer Energie. Um ein gleichzeitiges Eintreffen zweier Photonen bei den Elektronen im Fokuspunkt zu erreichen, sind sehr hohe Photonendichten erforderlich (mehrere kW/cm<sup>2</sup>), die nur ein gepulster Laser im Fokuspunkt erzielt. Und das ist genau der Vorteil dieses Prinzips:



Im konventionellen Modus (links) verursacht das kurzwellige blaue Anregungslicht im Präparat (grau) nicht nur im Fokus Fluoreszenz (grün) sondern auch darüber und darunter. Bei der 2-Photonen-Fluoreszenzanregung (rechts) ist die Entstehung von Fluoreszenz durch rotes Licht dagegen auf den Fokus beschränkt. Das führt zu qualitativ besseren Bildern.

Die Anregung der Moleküle erfolgt im Infraroten, also bei einer Wellenlänge, bei der die biologischen Proben weitestgehend transparent sind. Dies ermöglicht die hohe Eindringmesstiefen in die Proben (1 mm).

Spektrum des sichtbaren Lichts. Kurzwelliges Licht (links) ist energiereicher als langwelliges (rechts).



## 5-Achsen System

Die Universität Zürich stellte für die Gehirnforschung zehn 2-Photonen Mikroskope her. Für den Bau des Mikroskops war das Realisieren der Mechanik für das Positionieren des Lasers eine zentrale Aufgabe. Der Laserfokus muss bequem und schnell „von Hand“ in Position gebracht werden, von wo aus durch Verstellen eines Spiegels in der Optik ein 2 Dimensionales Bild gescannt wird.

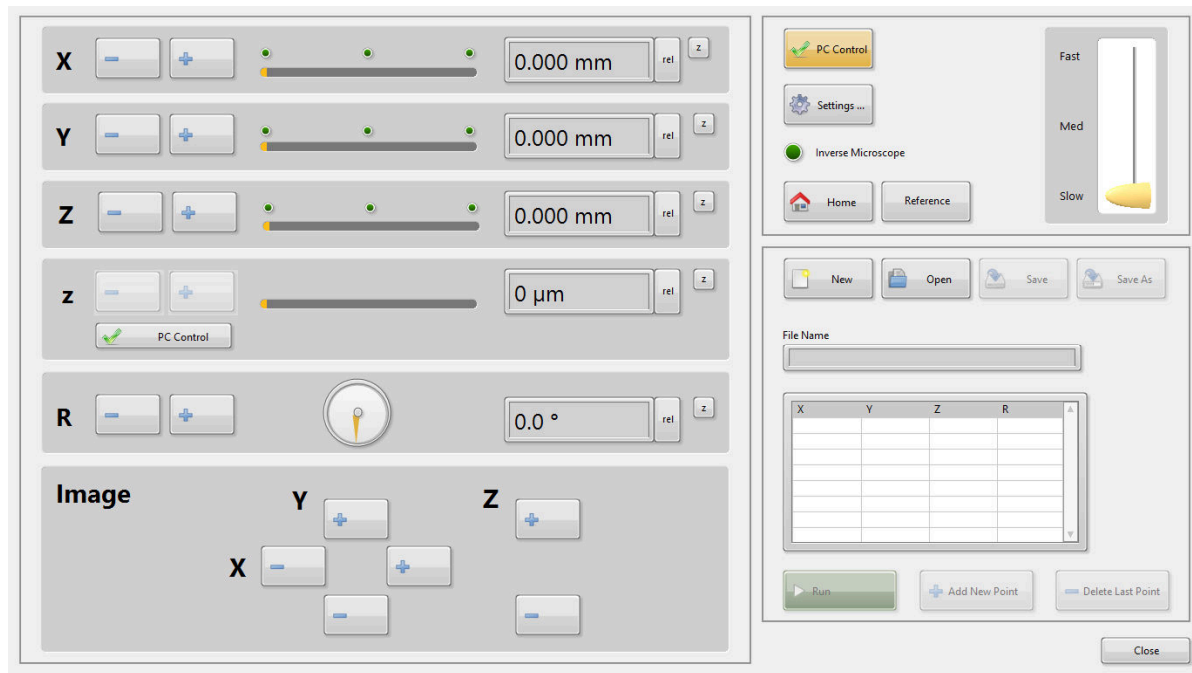
Die Positionierung erfolgt durch 4 mit Schrittmotoren angetriebene Achsen (X, Y, Z und einer Rotationsachse R). Für das Fokussieren der Optik wird ein Nanopositioniersystem mit Piezoantrieb von Physik Instrumente mit 800  $\mu\text{m}$  Verfahrweg eingesetzt. Die Ansteuerung der Schrittmotoren erfolgt über eine PCI Motion Karte von National Instruments. Die Vorgabewerte für das Nanopositioniersystem werden über RS 232 übermittelt.



### Handrad

Nebst der Bedienung auf einem Touchscreen wird ein elektronisches tragbares Handrad eingesetzt. Damit kann eine durch Knopf-Druck wählbare Achse durch Drehung des Handrades feinfühlig bewegt werden. Am Ort des Geschehens - nahe an der Probe – positioniert der Bediener den Laserfokus, ohne auf das Gerät schauen zu müssen. Da handelsübliche Handräder die Anforderungen für die Bedienung des 2-Photonen Mikroskops nicht erfüllten, wurde ein massgeschneidertes Gerät entwickelt.

## Steuerung



The screenshot displays the motion control software interface. On the left, there are five main control sections for axes X, Y, Z, z, and R. Each section includes directional buttons (minus and plus), a slider, a numerical input field, and a 'rel.' button. The X, Y, and Z axes are set to 0.000 mm, while the z-axis is set to 0  $\mu\text{m}$  and the R-axis to 0.0°. Below these is an 'Image' section with directional buttons for X, Y, and Z. On the right, there is a control panel with buttons for 'PC Control', 'Settings...', 'Inverse Microscope', 'Home', and 'Reference'. A speed slider is set to 'Med'. Below this is a file management section with 'New', 'Open', 'Save', and 'Save As' buttons, a 'File Name' input field, and a table with columns X, Y, Z, and R. At the bottom right are 'Run', 'Add New Point', 'Delete Last Point', and 'Close' buttons.

Die von Sotronik entwickelte „Motion-Software“ umfasst folgende Funktionen:

- Bedienoberfläche welche als Touchscreen Anwendung optimiert ist
- Ansteuern der 4 Hauptachsen X, Y, Z und B durch die Benutzeroberfläche oder Handrad
- Positions-Sollwertvorgabe des Nanopositioniersystems
- Steuern von Misch-Achsen in der Bildebene
- Funktionalität für das Fahren von Wegepunkte (Speichern, Editieren, Fahren, ...)
- Umschalten zwischen Handrad- und Touchpanel-Betrieb
- Parametrierung
- Fehler-Handling