Aus dem Institut für Lasermedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor Prof. Dr. med. R. Bayer

Untersuchungen zur Bestimmung der Durchmesserverteilung von Erythrozyten mittels Laserbeugung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lukas Schlösser

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Bayer
Korreferent: PD Dr. Schormann
Drittgutachter: Prof. Dr. Bongartz

1 Einleitung

Menschliche Erythrozyten sind kernlose bikonkave Scheiben, deren Durchmesser beim Gesunden um einen mittleren Wert von 7,5 µm annähernd normalverteilt sind[1]. Die Dicke der Zellen am Rande beträgt etwa 2 µm.

Für ihre Hauptaufgabe, den Gastransport, sind die roten Blutkörperchen durch ihr hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis günstig geformt und können sich zudem bei der Kapillarpassage stark deformieren, was die Mikroperfusion erst ermöglicht[2]. Veränderungen dieser normalerweise optimalen morphologischen und funktionellen Eigenschaften sind daher die pathophysiologische Ursache einiger Krankheiten. Diverse Erkrankungen führen zu bestimmten Veränderungen der Erythrozytengröße und -größenverteilung, deren Erkennung und richtige Interpretation zur Diagnostik meist unerläßlich sind. Die Morphologie des roten Blutbildes, beispielsweise in einem Blutausstrich beurteilt, weist somit bei einzelnen Krankheiten spezifische Besonderheiten auf. Neben der durchschnittlichen Größe der roten Blutkörperchen kann die Häufigkeitsverteilung der Erythrozytendurchmesser entscheidende Hinweise geben (Price-Jones-Kurve). Sie stellt sich normalerweise annähernd als Gauß-Glockenkurve mit einem Gipfel bei 7,5 µm dar. Es ist von besonderer Bedeutung, sowohl die mittleren Durchmesser als auch die Größenverteilung der Erythrozyten zu bestimmen, da hieraus differentialdiagnostische Überlegungen abgeleitet werden können.

Vor allem die Klassifizierungen einzelner Anämieformen seien hier genannt. Bei den Anämien kommt es zu charakteristischen Veränderungen der Erythrozytenmorphologie. Liegt die Spannbreite der Erythrozytendurchmesser zwischen 6,8 und 7,3 µm, spricht man von normozytären Zellen. Kleinere Zellen werden als mikro- (< 6,8 µm) und größere als makrozytär (> 8,5 µm) bezeichnet[3].

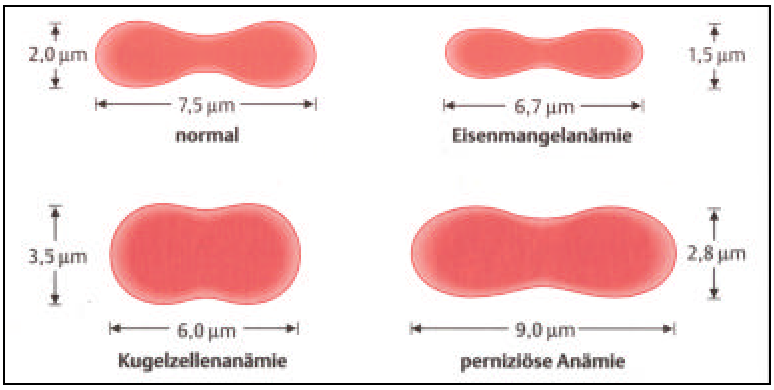


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Erythrozytendurchmesser und -dicke beim Gesunden und bei den wichtigsten Anämieformen (Quelle: Begemann).

Charakteristische Price-Jones-Verteilungen sollen hier zunächst an zwei wichtigen Anämien aufgezeigt werden. Die häufigste makrozytäre bzw. megaloblastäre Anämie ist die Perniziosa, bei der ein Mangel an Vitamin B_{12} zu einer Störung der Nukleinsäuresynthese führt[4]. Vor allem die Zellen der Erythropoese sind von dieser Reifungsstörung betroffen, die dazu führt, daß der Durchmesser der einzelnen Erythrozyten zwischen 4 und 14 µm liegt, woraus eine starke Basisverbreiterung der Price-Jones-Verteilung resultiert, deren Gipfel durch das Überwiegen der Makrozyten nach rechts verschoben ist[5].

Einen weiteren charakteristischen Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Erythrozytendurchmesser zeigt die Kugelzellanämie, die wichtigste korpuskuläre hämolytische Anämie. Hier findet man besonders kleine Erythrozyten mit einem Durchmesser von 6 µm und weniger. Daher ist die Price-Jones-Kurve stark nach links verschoben. Dem kleinen Erythrozytendurchmesser entspricht jedoch nicht das Zellvolumen (Mittleres Corpusculäres Volumen [MCV]), welches normal oder sogar erhöht ist. Dies liegt daran, daß die Zelldicke vergrößert ist und sich die Zellen der Kugelform annähern (Vgl. Abbildung 1). Wird in der Routinediagnostik etwa nur das MCV beachtet, können irreführende Schlußfolgerungen entstehen, die man durch die Bestimmung der Price-Jones-Verteilung vermeiden kann[6]. Dies zeigt erneut die Bedeutung der Erfassung der Erythrozytendurchmesser und v.a. auch der Häufigkeitsverteilung der Erythrozytendurchmesser.

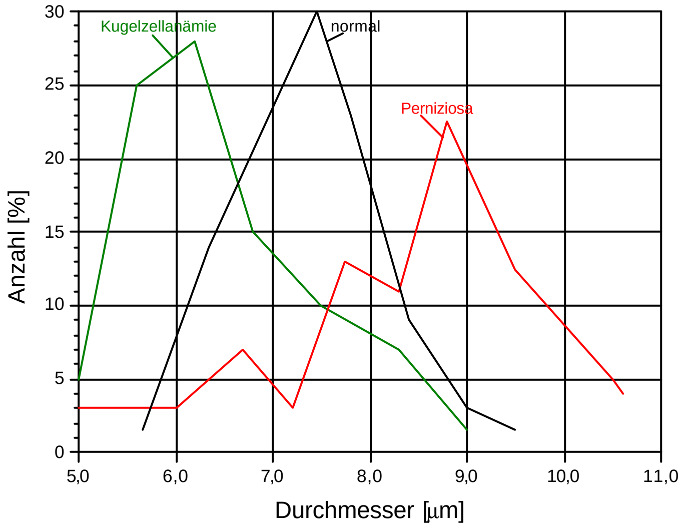


Abbildung 2: Price-Jones-Verteilungen einer Kugelzellanämie, eines Gesunden und einer perniziösen Anämie.

Nach Price-Jones erfolgt die Bestimmung der Erythrozytendurchmesser mittels mikroskopischer Messung, bei der mindestens 100 Erythrozyten (besser 500-1000) analysiert werden sollen. Mit Hilfe eines Objektmikrometers wird zunächst ein Okularmikrometer, das auf die Okularzwischenscheibe aufgelegt wird, durch Ausziehen des Mikroskoptubus so geeicht, daß ein Teilstrich des Okularmikrometers gleich 1 µm ist. In einem fixierten und nach Pappenheim (syn. panoptische Kontrastfärbung, gebräuchlichste Färbung eines Blutausstrichs) gefärbten Ausstrichpräparat werden jeweils der größte und kleinste Durchmesser einzelner Erythrozyten ausgemessen und der arithmetische Mittelwert notiert. Nach Einteilung der Zellen in Gruppen von 0,5 µm Größenunterschied werden nun die prozentualen Häufigkeiten ihres Vorkommens in Abhängigkeit von den Zellgrößen graphisch dargestellt.

Die Technik nach Price-Jones ist auf der einen Seite sehr aufwendig, da 1000 Zellen ausgemessen werden sollten. Dies kann aber immer noch nicht als statistisch repräsentativ angesehen werden. Zudem wird die optische Messung durch die Auflösung des Mikroskops (im optimalen Falle $l/2$) begrenzt. Es ist auch zu berücksichtigen, daß es durch die Fixation zu einer Erythrozytenschrumpfung kommt und asymmetrische Zellen schwierig einzuordnen sind. Auf der anderen Seite bietet die Technik nach Price-Jones allerdings die Möglichkeit, jede Zelle einzeln zu betrachten, um daraus schließlich eine Gesamtaussage über die Erythrozytenpopulation zu formulieren.

Ein verwandtes Verfahren nutzt die Photographien mikroskopischer Bilder. Unter einem Mikrophotogerät werden zwei Gesichtsfelder eines dünnen Blutausstriches 1000-fach vergrößert photographiert, so daß etwa 100 Erythrozyten abgebildet sind. Mit Hilfe einer auf 0,1 mm geeichten Meßlupe können nun die Durchmesser jedes einzelnen Erythrozyten gemessen werden. Die Summe der Meßwerte, dividiert durch die Zahl der gemessenen Erythrozyten, ergibt den mittleren Durchmesser. Als Variante zu diesem Verfahren kann man das mikroskopische Bild einer Blutprobe auch in einer Neubauer-Zählkammer, wie sie sonst zur Erythrozytenzählung verwendet wird, mit ihren genau definierten Zählfeldern als Eichungsmaßstab anfertigen, wobei auf die hier sonst verwendete Hayem'sche Lösung (Verdünnungsflüssigkeit bei der Erythrozytenzählung, die durch ihren hohen Gehalt an SO_4^{2-}-Ionen die negative Ladung der Erythrozyten erhöht und dadurch die Agglutination und ungleichmäßige Verteilung auf der Zählfläche verhindert.) verzichtet werden sollte. Diese Lösung führt nämlich aufgrund ihrer Hyperosmolarität zu Schrumpfungen der Zellen.

Die mikroskopische Price-Jones-Technik wurde aufgrund ihrer Aufwendigkeit weitestgehend durch die Bestimmung der Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width [RDW]) abgelöst, einem Variationskoeffizient, der als Maß für die Anisozytose der Erythrozyten bestimmt wird. In Zellzählautomaten, die Histogramme von Blutkörperchen erstellen können, werden auf dem MCV basierend die *Volumina* von ca. 100 000 Erythrozyten ermittelt. Der RDW wird in [%] angegeben und besagt, welcher Prozentsatz der Erythrozyten vom mittleren MCV abweicht.

Das derzeit am häufigsten angewandte Verfahren zur Erythrozytengrößenbestimmung ist die Impedanzmessung in elektronischen Zählautomaten. Dieses sog. Coulter-Meßprinzip[7] bestimmt Größe und Anzahl von Zellen, die in einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit suspendiert sind. Diese Zellsuspension wird durch eine kapillare Öffnung gesogen. Dabei bewirkt jede Zelle eine kurze Widerstandserhöhung in einem elektrischen Feld zwischen der inneren und der äußeren Meßelektrode. Die Amplitude des jeweils gemessenen Impulses ist proportional zum *Volumen* der gemessenen Zelle[8]. Als Ergebnis wird ein Histogramm ausgegeben, das die Partikelgröße gegen die Volumenkonzentration [fl] darstellt.

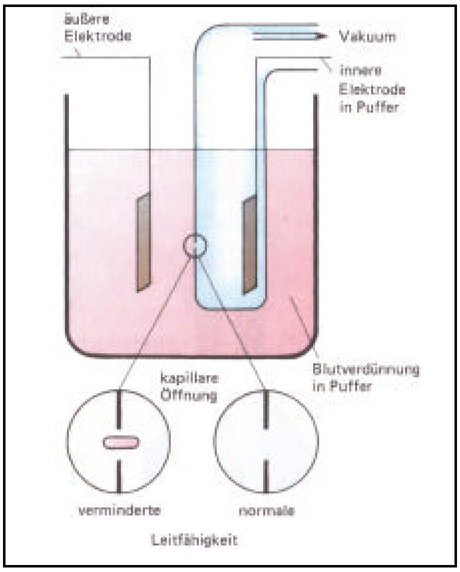


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Blutkörperchenzählers mit Impedanzmessung (Quelle: Dörner).

An dieser Stelle sei erneut darauf hingewiesen, daß in den zuvor erwähnten elektronischen Zählgeräten die Volumina und nicht die Durchmesser der Zellen bestimmt werden und einige potentielle Fehlerquellen existieren[9]. So müssen die Daten mitgezählter Leukozyten eliminiert werden. Außerdem arbeiten diese Geräte teilweise mit hypoosmolaren Lösungen, die Sphärozyten erzeugen. Auch das unterschiedliche osmotische Verhalten des Blutes muß berücksichtigt werden. Pathologische Veränderungen der Membraneigenschaften der Erythrozyten können ebenfalls zu Meßfehlern führen.

Die ersten Versuche, die Beugung von Licht in der Labordiagnostik einzusetzen, gehen auf Experimente von Thomas Young aus dem Jahre 1813 zurück[10]. Young gelang es unter Verwendung von Sonnenlicht, den mittleren Durchmesser von Erythrozyten in einem Blutausstrich durch Messung der Größe der entstehenden Beugungsringe annähernd zu bestimmen. Ein weiteres geschichtliches Verfahren zur Bestimmung des Erythrozytendurchmessers ist das Erythrozytometer (nach Bock)[11]. Es benutzt ebenfalls Beugung zur Bestimmung des Durchmessers und reicht als grobe Orientierung aus. Zwei parallel laufende, durch runde Öffnungen in einer Deckplatte erzeugte Lichtstrahlen aus einer gewöhnlichen Glühlampe, werden auf einen Blutausstrich gesandt. Auf einer Mattscheibe erscheinen diese als runde Farbhöfe, die sich durch Verschieben eines Rohres vergrößern oder verkleinern lassen. Berühren sie sich eben, so läßt sich an einer in [µ] geeichten Skala der jeweilige Erythrozytendurchmesser ablesen.

Eine moderne Methode zur Bestimmung der Geometrie von Erythrozyten in wäßriger Suspension ist die Laserdiffraktoskopie. Nach der Grundidee, die Gestalt von Erythrozyten anhand ihrer Beugungsbilder zu beurteilen, stellten die Arbeitsgruppen Bessis und Mohandas[12,13,14] und Morris[15] diese Methode zur Messung der Erythrozytenflexibilität vor. Weitere Verbesserungen des Meßsystems wurden durch Hardemann et al.[16] und der Arbeitsgruppe von Bayer[17,18,19,20,21] vorgeschlagen. Ein Laserstrahl mit der Wellenlänge 633 nm wird in die Rotationsachse eines Viskosimeters gesandt, das im wesentlichen aus drei Zylindern (Vgl. Abbildung 4) besteht. In einen schmalen Meßspalt (0,5 mm), der sich zwischen dem mittleren und dem äußeren, feststehenden Zylindern befindet, wird die verdünnte Blutprobe eingebracht (Hämatokrit ca. 1%). Der mittlere Zylinder wird durch einen Gleichstrommotor mit definierten Geschwindigkeiten angetrieben, so daß die Erythrozyten innerhalb des Spaltes Schubspannungen ausgesetzt und gedehnt werden. Es erfolgt eine elipsoide Verformung der Zellen, die eine Verformung des runden in ein elipsoides Beugungsbild zur Folge hat. Das auf dem Schirm sichtbare Beugungsbild wird von einer CCD-Kamera unter einem feststehenden Winkel aufgezeichnet und an einen Computer übermittelt. Mit Hilfe eines speziell entwickelten Programms kann die Form des Beugungsbildes analysiert und quantifiziert werden.

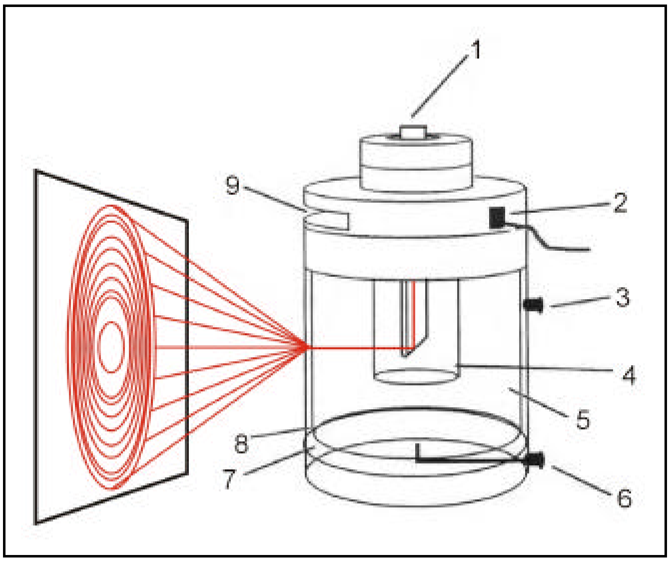


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Probenzylinders und des Schirms mit entstehendem Beugungsbild. 1 = Laser, 2 = Lichtschranke zur Positionssteuerung, 3 = Einlaß für Spülflüssigkeit, 4 = innerer Zylinder, gefüllt mit Triton X-100 (Phase-matching), mit Umlenkspiegel, 5 = mittlerer Zylinder, gefüllt mit Triton X-100 (Phase-matching), 6 = Ein- bzw. Auslaß für Blutproben, 7 = äußerer Zylinder mit der Dextran-Blut-Suspension, 8 = Meßspalt (0,5 mm), zwischen mittlerem und äußerem Zylinder, 9 = Fräsung für den Antriebsriemen.

Neben der Erythrozytenflexibilität läßt sich durch Auswertung des Beugungsbildes bei Kenntnis der Wellenlänge, des Abstandes des Lasers zu den Beugern und dem ersten Minimum im Beugungsbild hochpräzise der mittlere Durchmesser der sich im vom Laser durchstrahlten Volumen befindenden Erythrozyten (ca. 200.000 Zellen) bestimmen. Eine Aussage über die Größenverteilung ist jedoch nicht möglich.

Es stellt sich die Frage, wie die Information über die Durchmesserverteilung der Erythrozyten aus dem Beugungsbild gezogen werden kann. In der vorliegenden Arbeit soll daher geprüft werden, ob und inwieweit die Beugung von monochromatischem Licht als Verfahren zur Bestimmung der Durchmesserverteilung einer Erythrozytenpopulation geeignet ist. Dieser Ansatz liegt nahe, da uns heute aufgrund der Lasertechnologie monochromatisches Licht in einem breiten Wellenlängenbereich zur Verfügung steht.

2 Grundlagen der Fourier-Optik

In diesem Kapitel werden zunächst allgemeine physikalische und mathematische Grundlagen systematisch dargestellt, um schließlich die Vorgänge der Beugung und der Fourier-Optik erläutern zu können. Über die mathematische Herleitung der Fourier-Transformation hinaus stellt deren Anwendung auf die Beugung an kreisförmigen Objekten einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Eine Aufstellung der Fourier-Gesetze schließt das Kapitel ab.

2.1 Licht als Welle

In der Geschichte der Optik haben Wissenschaftler, um die in ihrer Umwelt beobachteten Vorgänge verstehen und erklären zu können, verschiedene Modelle aufgestellt. Da häufig spekulative Hypothesen formuliert worden waren, versuchte Sir Isaac Newton (1642-1727) auf direkte Beobachtungen aufbauend, die wirkliche Natur des Lichtes zu ergründen. Seine beiden Theorien lauteten: War Licht korpuskular, d.h. ein Strom von Teilchen? Oder war es eine Welle in einem alles durchdringendem Medium, dem Äther? Während Newton zunächst darauf bedacht war, beide Theorien zu erfassen, neigte er später doch mehr zu der Korpuskeltheorie. Christian Huygens (1629-1695) baute hingegen zur selben Zeit seine Wellentheorie aus, die im Folgenden dieser Arbeit angewandt wird. Huygens erkannte beispielsweise, daß Licht beim Eintritt in dichtere Medien erheblich langsamer wird. Er war außerdem in der Lage, Reflexions- und Brechungsgesetze herzuleiten. Erst im Jahr 1801 nahm die Optik wieder neuen Aufschwung mit Thomas Young (1773-1829), der das Interferenzprinzip einführte, ein Überlagerungsprinzip für Wellen.

In der Natur gibt es zahlreiche Beispiele für Wellenbewegungen. Befestigt man ein Seil an einer Wand und bewegt das freie Ende mit einer Hand auf und ab, so entsteht eine fortschreitende Welle. Ebenso sind Schallwellen oder Kreiswellen (z.B. beim Wurf eines Steines ins Wasser entstehend) Beispiele für Wellenformen.

Da die in den weiteren Kapiteln folgenden Betrachtungen der Beugungseffekte durch das Wellenmodell anschaulich erläutert werden können, betrachtet man zuerst allgemein eine Welle.

Eine Wellenbewegung ist ein Vorgang, bei dem sich eine physikalische Größe periodisch als Funktion der Zeit und des Ortes ändert. Es handelt sich bei diesem Vorgang um die Ausbreitung einer Anregung in einem kontinuierlichen Medium. Bei Transversalwellen erfolgt die Schwingung, die der Wellenbewegung zugrunde liegt, senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle (z.B. bei elektromagnetischen Wellen). Bei longitudinalen Wellen finden die Schwingungen in Ausbreitungsrichtung statt. Ein bekanntes Beispiel sind die Schallwellen.

Es soll auf einige allgemeine Eigenschaften der Wellen kurz eingegangen werden. Daher betrachtet man die einfachste Wellenform, in der die Form der Welle eine Sinus- oder Kosinuskurve ist. Man bezeichnet sie als harmonische Welle. Die sich verändernde Größe nennt man Auslenkung $w(x,t)$, wobei x der Ort und t die Zeit sind.

Eine eindimensionale harmonische Welle ist folgendermaßen definiert:

$$w(x,t) = A \cdot \cos(wt - kx - a) \qquad [\,2.1\text{-}1\,]$$

Hierbei ist $w = 2p \cdot f = 2p \cdot T^{-1}$ die Kreisfrequenz. f steht hier für die Frequenz, T ist die Periode der Welle und a die Phase, welche eine Verschiebung der Welle auf der x-Achse bewirkt, wobei sich die Wellenform nicht ändert. A stellt die Amplitude dar, während $k = 2p \cdot l^{-1}$ als Wellenzahl bezeichnet wird und eine positive Konstante ist.

Setzt man die Kreisfrequenz w und die Wellenzahl k ein, so gilt die allgemeine Gleichung einer harmonischen Welle[22]:

$$w(x,t) = A \cdot \cos\left(\frac{2p}{T} \cdot t - \frac{2p}{l} \cdot x - a\right) \qquad [\,2.1\text{-}2\,]$$

Hält man entweder x oder t konstant, führt dies zu einer kosinusförmigen Auslenkung. So ist die Welle in Raum und Zeit periodisch. Es ergibt sich bei fester Zeit $t = 0$ und einer Phase $a = 0$ die Abhängigkeit $w(x,0) = A \cdot \cos(2p \cdot l^{-1} \cdot x)$, welche graphisch folgendes Bild liefert:

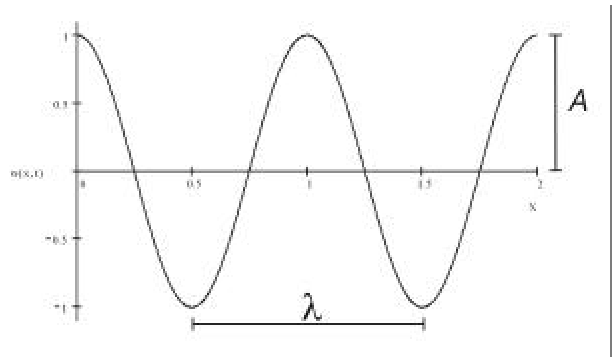


Abbildung 5: Bild einer harmonischen Welle bei fester Zeit. Es ist die Wellenlänge λ eingezeichnet. Den maximalen y-Achsen-Wert nennt man die Amplitude.

Die räumliche Periode bezeichnet man als die Wellenlänge λ. Die Einheit von λ ist Meter, wobei Licht im sichtbaren Bereich Wellenlängen von $400 \cdot 10^{-9}\,m$ bis $800 \cdot 10^{-9}\,m$ hat. Anstelle von $10^{-9}\,m$ kann man auch nm schreiben. Bei festem Ort $x = 0$ und einer Phase $\alpha = 0$ erhält man vollkommen analog die Gleichung $w(0,t) = A \cdot \cos(2\pi \cdot T^{-1} \cdot t)$, mit der man die zeitliche Periode T untersuchen kann. Sie ist die Zeit, die eine vollständige Welle benötigt, um an einem ruhenden Beobachter vorbeizulaufen.

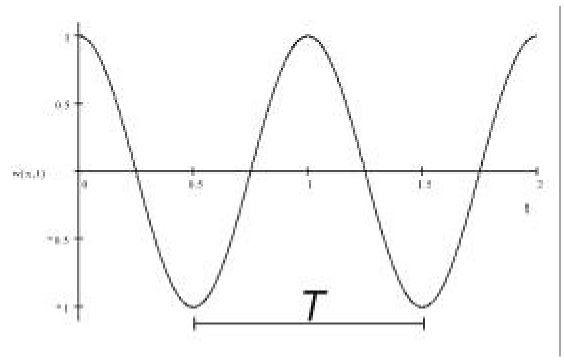


Abbildung 6: Eine harmonische Welle bei festem Ort. T stellt die zeitliche Periode dar.

Die Darstellung der Wellen mit Hilfe komplexer Zahlen bietet im Vergleich zu der mit Sinus- und Kosinusfunktionen eine alternative Beschreibung, mit der mathematisch einfacher zu arbeiten ist, da die trigonometrische Handhabung bei schwierigeren Ausdrücken sonst recht umständlich wird.

Die komplexe Zahl z hat die Form

$$z = x + iy \,, \qquad [\,2.1\text{-}3\,]$$

wobei $i = \sqrt{-1}$ ist. Der reelle und der imaginäre Teil von z sind jeweils x und y, wobei sowohl x als auch y selbst reelle Zahlen sind. Dies ist graphisch im Argand-Diagramm der Abbildung 7 dargestellt. Mit Polarkoordinaten (r, q) erhält man $x = r \cdot \cos q$ und $y = r \cdot \sin q$.

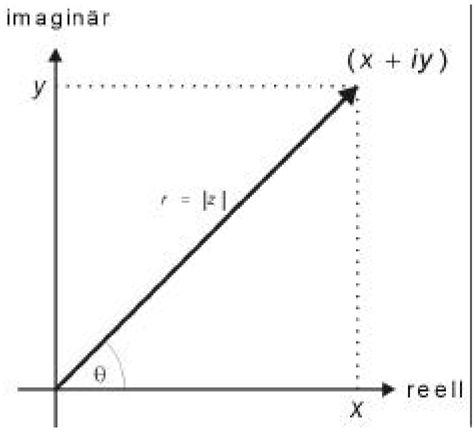


Abbildung 7: Argand-Diagramm.

Jede komplexe Zahl z kann als die Summe eines Realteils Re*(z)* und eines Imaginärteils Im*(z)* dargestellt werden,

$$z = \mathrm{Re}(z) + i \cdot \mathrm{Im}(z)\,. \qquad [\,2.1\text{-}4\,]$$

Aus der polaren Form, in der $\mathrm{Re}(z) = r \cdot \cos q$ und $\mathrm{Im}(z) = r \cdot \sin q$ sind, folgt, daß jeder der beiden Anteile gewählt werden kann, um eine harmonische Welle zu beschreiben. Es ist jedoch üblich, den Realteil zu wählen, wobei eine harmonische Welle beschrieben wird als

$$w_K(x,t) = \mathrm{Re}\left[A \cdot e^{i \cdot (wt - kx - a)}\right] \qquad [\,2.1\text{-}5\,]$$

Die komplexe Darstellung der harmonischen Welle geschieht daher allgemein wie folgt:

$$\boxed{w_K(x,t) = A \cdot e^{i \cdot (wt - kx - a)}} \qquad [\,2.1\text{-}6\,]$$

In den folgenden Kapiteln wird auf diese komplexe Schreibweise der Wellen noch häufiger zurückgegriffen werden, um Beugungserscheinungen berechnen zu können. Erst beim Schlußresultat wird der Realteil gebildet und zwar nur dann, wenn eine reale Welle dargestellt werden soll.

Als eine Form der harmonischen Wellen sei hier auch die ebene Welle genannt. Die ebene Welle ist ein einfaches Beispiel einer dreidimensionalen Welle. Beobachtet man ebene Wellen zu einer bestimmten Zeit, so stellen alle Flächen gleicher Phase jeweils ebene Wellenfronten dar, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung stehen. Die mathematische Definition einer ebenen Welle folgt in Kapitel 2.2.

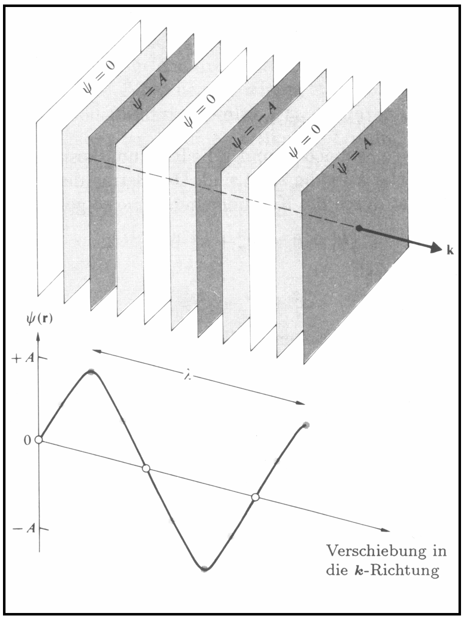


Abbildung 8: Wellenfronten für eine harmonische ebene Welle (Quelle: Hecht, Abb. 2.13, S.23).

2.2 Beugung am Spalt als Elementarwellenmodell

Das Phänomen der Beugung läßt sich anhand von Wellen erklären, die in Wechselwirkung mit einem Hindernis treten[23]. Hierbei ist es primär nicht von Interesse, ob es sich um Licht-, Wasser- oder Schallwellen handelt, da man die Erscheinungen bei allen Formen von Wellen findet[24]. Unter optischer Beugung versteht man die Abweichung der Lichtausbreitung von den Gesetzen der geometrischen Optik, die immer dann auftritt, wenn die freie Ausbreitung der Wellen durch Objekte geändert wird[25]. Hinter den Beugungsobjekten treten Lichtstrahlen auf, die in der Richtung von dem einfallenden Licht abweichen.

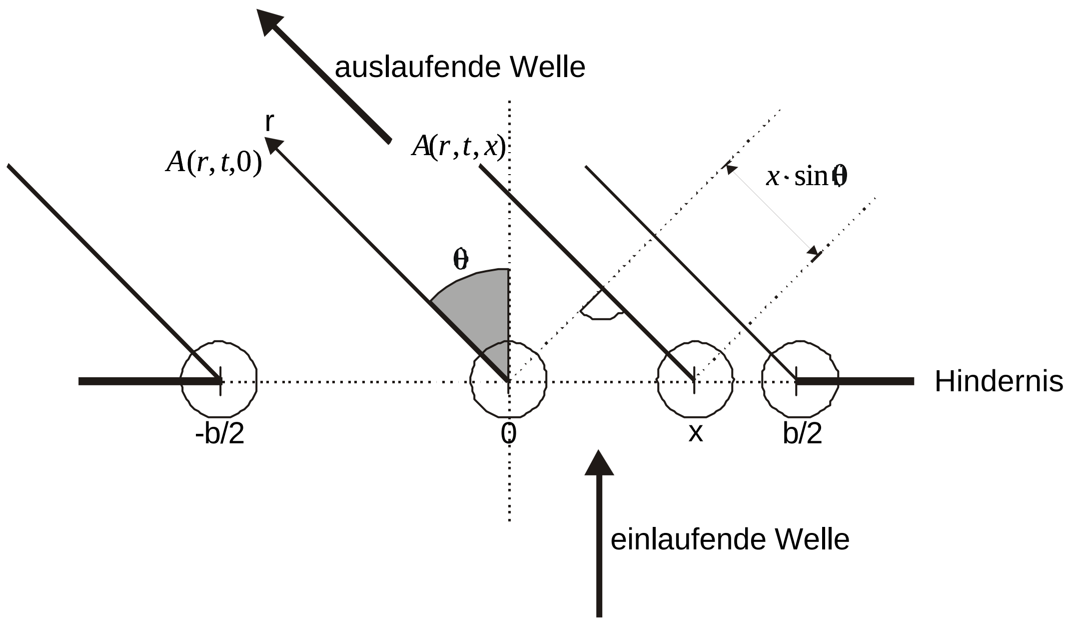


Abbildung 9: Elementarwellenmodell zur Erklärung der Beugung am Spalt der Breite b [-b/2,b/2]. Man betrachtet zwei Wellenzüge von 0 und x ausgehend.

Man schaut sich beispielsweise eine ebene Welle an, die auf eine Barriere trifft, in der sich ein Spalt befindet. Der Spalt habe die Breite b. Jeder Punkt dieses Spaltes kann nach dem Huygens'schen Prinzip als Quelle sekundärer, kugelförmiger Elementarwellen angesehen werden. Hinter dem Spalt breiten sich diese Elementarwellen in alle Richtungen aus und überlagern sich in Phase und Amplitude. In Richtung des Winkels q zur Senkrechten sieht man dann eine aus der Summe der einzelnen Kugelwellen zusammengesetzte Welle. Unter Fraunhofer'schen Bedingungen (Vgl. Kapitel 2.3) überlagert sich die vom Punkt x ausgesandte Welle mit der vom Ort 0 in einem weit entfernten Beobachtungspunkt. Ist der Beobachtungsschirm unendlich weit von der Öffnung entfernt, so ist die Fraunhofer'sche Bedingung erfüllt. Für kleine Spaltbreiten kann man dies bei sichtbarem Licht allerdings auch durch ausreichend große Abstände realisieren (Vgl. [2.3-2]).

Die Amplitude einer ebenen Welle, die vom Punkt 0 in Richtung r ausgeht, ist:

$$A(r,t,0) = A_0 \cdot e^{i\cdot(w\cdot t - k\cdot r)} \qquad [\ 2.2\text{-}1\ ]$$

Ausgehend mit gleicher Phase ist die Welle vom Ort x allerdings ein Stück, nämlich $x \cdot \sin q$, weiter gelaufen. Für den Phasenunterschied beider Wellen ist das Verhältnis dieser Strecke zur Wellenlänge $(x \cdot \sin q)/\,l = x \cdot k \cdot \sin q$ maßgebend, wobei die Wellenzahl $k = 2p\ /\ l$ ist. $w = 2p\ /T$ bezeichnet die Kreisfrequenz.

Vom Ort x kommend ist die Amplitude einer um $x \cdot k \cdot \sin q$ in der Phase verschobenen Welle gegeben durch:

$$A(r,t,q,x) = A_0 \cdot e^{i\cdot(w\cdot t - k\cdot r - k\cdot x\cdot \sin q)} = A(r,t,0)\cdot e^{i\cdot(-k\cdot x\cdot \sin q)} \qquad [\ 2.2\text{-}2\ ]$$

Wählt man über der Spaltbreite N Punkte als Ausgangsorte einer einzelnen Welle, so erhält man die Amplitude am weit entfernten Schirm als Summe von N Wellen $n = 1,2,...,N$, wobei jede eine individuelle Phase trägt:

$$A(r,t,q) = \sum_{n=1,2,\ldots N} A(r,t,0)\cdot e^{-i\cdot k\cdot x_n \cdot \sin q} \qquad [\ 2.2\text{-}3\ ]$$

Weil der Spalt kontinuierlich ist, kann die Summation durch das entsprechende Integral ersetzt werden:

$$A(r,t,q) = \frac{1}{b}\cdot \int_{-b/2}^{b/2} A(r,t,0)\cdot e^{-i\cdot k\cdot x\cdot \sin q}dx = A(r,t,0)\cdot \frac{1}{b}\cdot \int_{-b/2}^{b/2} e^{-i\cdot k\cdot x\cdot \sin q}dx$$

$$= A(r,t,0)\cdot A(q) \qquad [\ 2.2\text{-}4\ ]$$

Der Faktor *1/b* dient der Normierung. Integriert man nun den vom Spalt abhängigen Anteil

$$A(q) = \frac{1}{b}\cdot \int_{-b/2}^{b/2} e^{-i\cdot k\cdot x\cdot \sin q}dx = \frac{1}{-i\cdot k\cdot b\cdot \sin q}\left[e^{-i\cdot k\cdot x\cdot \sin q}\right]_{-b/2}^{b/2}, \qquad [\ 2.2\text{-}5\ ]$$

so erhält man mit Hilfe der Euler‘schen Beziehung $e^{i\cdot\varphi} = \cos\varphi + i\cdot\sin\varphi$, aus der folgt $e^{i\cdot\varphi} - e^{-i\cdot\varphi} = 2\cdot i\cdot\sin\varphi$, das Ergebnis:

$$A(\theta) = \frac{e^{i\cdot k\cdot\frac{b}{2}\cdot\sin\theta} - e^{-i\cdot k\cdot\frac{b}{2}\cdot\sin\theta}}{i\cdot k\cdot b\cdot\sin\theta}$$

$$\Rightarrow A(\theta) = \frac{\sin(k\cdot b/2\cdot\sin\theta)}{k\cdot b/2\cdot\sin\theta} \qquad [\ 2.2\text{-}6\ ]$$

Dies ist die in Richtung θ abgestrahlte Amplitude. Das Quadrat des Betrags der Amplitude liefert die in Richtung θ abgestrahlte Intensität:

$$\boxed{I(\theta) = |A(\theta)|^2 = \left[\frac{\sin(k\cdot b/2\cdot\sin\theta)}{k\cdot b/2\cdot\sin\theta}\right]^2} \qquad [\ 2.2\text{-}7\ ]$$

Mehrere Wellen können sich gegenseitig verstärken oder abschwächen. Stellt man sich vor, daß zwei Wellenbewegungen mit gleicher Wellenlänge von zwei Quellen ausgehen, so addieren sich die Schwingungen in jedem Raumpunkt nach dem Superpositionsprinzip. Sind die Wellen in Phase, Wellenberge und Wellentäler treten also zur gleichen Zeit auf, so interferieren die beiden Wellen und ergeben eine Welle, bei der sich die Amplituden der einzelnen Wellen addieren, wobei die Wellenlänge gleich bleibt. Man spricht von konstruktiver Interferenz. Sind die beiden Wellen jedoch außer Phase, ein Wellenberg trifft auf ein Wellental, so löschen sich die Wellen gegenseitig aus. Man spricht von destruktiver Interferenz. Ganz allgemein kann man diese Überlegung für jeden Punkt im Interferenzfeld anstellen. In jedem Raumpunkt addieren sich die Schwingungen und verstärken oder schwächen sich je nach Phasenlage. So entsteht bei der Beugung am Spalt ein charakteristisches Beugungsmuster mit seinen Minima und Maxima (Vgl. Abbildung 10).

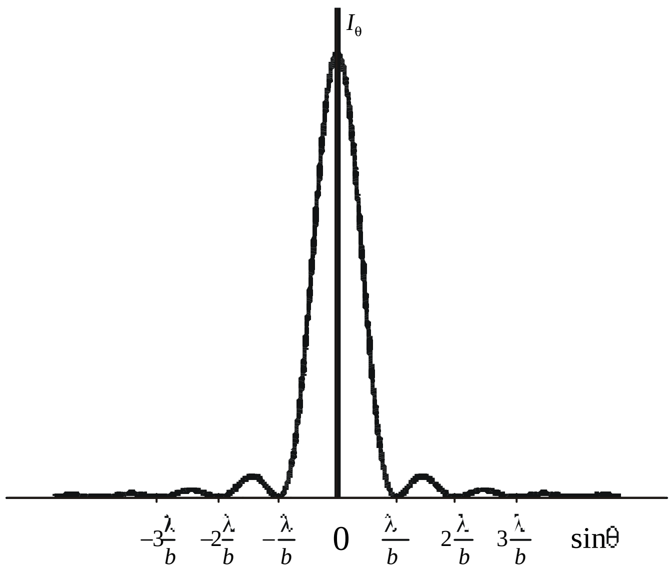


Abbildung 10: Intensitätsverteilung bei der Beugung am Spalt (Vgl. [2.2-7].

$I(q)$ ist minimal, wenn der in [2.2-7] enthaltene Zähler gleich Null ist:

$$\sin(k \cdot b/2 \cdot \sin q) = 0 \qquad [\,2.2\text{-}8\,]$$

$$k \cdot b/2 \cdot \sin q = n \cdot p \ \text{ (Vielfache von } p\text{)} \qquad [\,2.2\text{-}9\,]$$

$$\text{Da } k = \frac{2p}{l}\text{ , folgt } \ b \cdot \sin q = n \cdot l\ . \qquad [\,2.2\text{-}10\,]$$

Das erste Minimum (n=1), d.h. die Mitte des ersten dunklen Interferenzstreifens, erhält man dann für $\sin q = \frac{l}{b}$,das zweite (n=2) für $\sin q = \frac{2l}{b}$ und das dritte (n=3) für $\sin q = \frac{3l}{b}$.

$I(q)$ wird maximal, wenn $\sin(k \cdot b/2 \cdot \sin q) = 1$. Dafür muß der Ausdruck $k \cdot b/2 \cdot \sin q$ ungeradzahlige Vielfache von $\frac{p}{2}$ liefern. Also schreibt man:

$$k \cdot b/2 \cdot \sin q = (2n+1) \cdot p/2 \qquad [\,2.2\text{-}11\,]$$

Daraus folgt:

$$\sin q = \frac{2n+1}{2} \cdot \frac{l}{b} \qquad [\,2.2\text{-}12\,]$$

Das erste Maximum (n=1) erhält man für

$$\sin q = \frac{3\,l}{2b} \qquad [\,2.2\text{-}13\,]$$

und das zweite bei n=2 für $\sin q = \frac{5\,l}{2b}$.

Für kleine Winkel erhält man das Zentralmaximum 0-ter Ordnung, denn $\lim\limits_{z \to 0}(\frac{\sin z}{z}) = 1$.

Aus der Formel [2.2-7] ergibt sich letztlich auch, daß sich die Beugungsbildausdehnungen reziprok zu denen des Objekts verhalten. Ein breiter Spalt liefert also eine schmale Beugungsfigur. Umgekehrt vergrößert sich das Beugungsbild bei Verkleinerung der Vorlage. Da kein Licht verloren geht, ändert sich die Helligkeit des Beugungsbildes entsprechend seiner Größe.

2.3 Fraunhofer'sche Bedingung

In den vorherigen Darstellungen kam Beugung unter Fraunhofer'schen Bedingungen schon vor. Nun soll überprüft werden, ab wann man sie beobachtet. Mit Hilfe der Formel [2.2-13] kann man berechnen, welche Bedingung für die Fraunhofer'sche Beugung (auch Fernfeldbeugung genannt) erfüllt sein muß. Sie gilt für große Entfernungen von der beugenden Ebene. Es sei eine Entfernung l_∞ gegeben, oberhalb der die erste Ordnung zu erkennen ist. Unterhalb l_∞ kommt es zu Überlagerungen der Ordnungen, daher existiert dort (ohne eine Linse) keine reine Beugungsfigur.

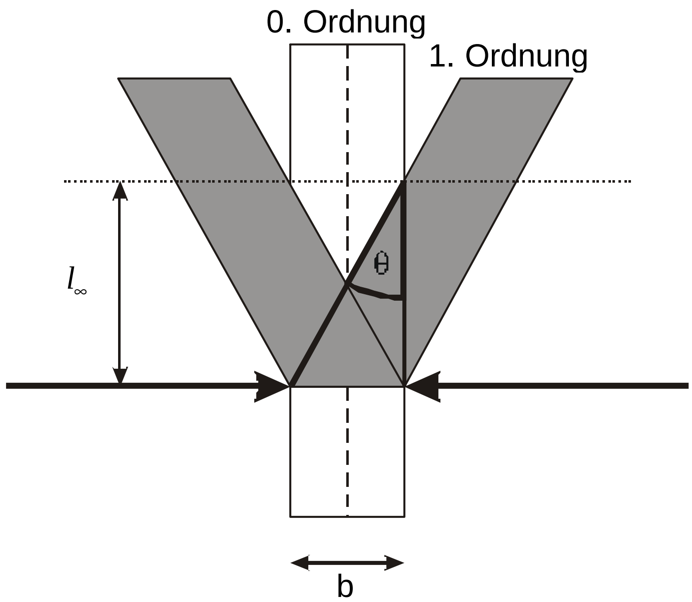


Abbildung 11: Skizze zur Erklärung der Fraunhofer'schen Bedingung.

Aus der Zeichnung folgt, daß

$$l_\infty \cdot \sin\theta = b\,. \qquad [\,2.3\text{-}1\,]$$

Formel [2.2-13] gibt den Winkel an, bei dem die erste Ordnung erscheint. Setzt man diese Formel in [2.3-1] ein, so erhält man eine Gleichung für den Übergang vom Nahfeld in den reinen Beugungsbereich. Ab dieser Entfernung tritt die erste Ordnung aus dem Schattenriß des Objekts, der in etwa die Breite der 0. Ordnung anzeigt.

$$l_\infty = \frac{2b^2}{3l} \qquad [\,2.3\text{-}2\,]$$

Ab dieser Länge l_∞ ist die Fraunhofer'sche Bedingung erfüllt. Bei einem 1 mm großen Objekt und Verwendung sichtbaren Lichtes muß der Beobachtungsschirm also mindestens 2 m entfernt sein, um Beugung im Fernfeld ohne eine Linse beobachten zu können. Bei Erythrozyten als Beuger und Verwendung eines Lasers (633 nm) ist die Fraunhofer'sche Bedingung schon ab 0,06 mm erfüllt.

2.4 Mathematik der Fourier-Transformation

Die Fourier-Transformation ist eine Form der Frequenzanalyse[26]. Sie wird angewandt, um Vorgänge in Hinblick auf ihre Frequenzgehalte zu untersuchen.

Eine periodische Funktion $f(x)$ läßt sich mit einer Fourier-Reihe darstellen:

$$f(x) = \frac{A_0}{2} + \sum_{m=1}^{\infty} A_m \cos(mkx) + \sum_{m=1}^{\infty} B_m \sin(mkx) \qquad [\,2.4\text{-}1\,]$$

Wobei $k = 2p / l$ ist. Die Fourier-Koeffizienten A_m und B_m berechnen sich als:

$$\begin{aligned} A_m &= \frac{2}{l}\int_0^\infty f(x)\cos(mkx)\,dx \\ B_m &= \frac{2}{l}\int_0^\infty f(x)\sin(mkx)\,dx \end{aligned} \qquad [\,2.4\text{-}2\,]$$

Soll eine nicht-periodische Funktion $f(x)$ durch periodische Funktionen dargestellt werden, so beschreibt man die Nicht-Periodizität von $f(x)$ durch eine Periode $l = \infty$. Die Fourier-Reihe geht dabei in ein Fourier-Integral über, das eine Linearkombination unendlich vieler harmonischer Beiträge ist:

$$f(x) = \frac{1}{p}\left[\int_0^\infty A(k)\cos(kx)dk + \int_0^\infty B(k)\cos(kx)dk\right] \qquad [\,2.4\text{-}3\,]$$

Die Fourier'schen Kosinus- und Sinus-Koeffizienten $A(k)$ und $B(k)$ berechnen sich als:

$$A(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)\cos(kx)dx$$

$$B(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)\sin(kx)dx \qquad [\ 2.4\text{-}4\ ]$$

Auf diese Weise vergleicht man die tatsächliche Frequenz - hier die Funktion $f(x)$ - mit allen Frequenzen (hier: 0 bis ∞). Entspricht die ausgewählte Funktion der tatsächlichen Funktion $f(x)$, so liefert das Integral einen Wert ungleich Null. Dieser Wert stellt die Amplitude der Frequenz dar. Mit Hilfe der Euler'schen Beziehung $e^{i\cdot j} = \cos j + i \cdot \sin j$ und einigen anderen Umformungen kann man die obigen Integrale auch komplex schreiben:

$$f(x) = \frac{1}{2p}\int_{-\infty}^{+\infty} F(k)e^{-i\cdot k\cdot x}dk \qquad [\ 2.4\text{-}5\ ]$$

Hierbei ist

$$\boxed{F(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)e^{i\cdot k\cdot x}dx} \qquad [\ 2.4\text{-}6\ ]$$

die Fourier-Transformierte von $f(x)$. Für die Kosinus- bzw. Sinus-Koeffizienten $A(k)$ und $B(k)$ besteht zu der Fourier-Transformierten $F(k)$ der Zusammenhang: $F(k) = A(k) + i \cdot B(k)$, d.h. $A(k)$ und $B(k)$ sind Real- und Imaginärteil von $F(k)$. $|F(k)|$ ist das Amplitudenspektrum. Weil $F(k)$ die Transformierte von $f(x)$ ist, wird $f(x)$ selbst die inverse Fourier-Transformation von $F(k)$ genannt.

2.5 Fourier-Transformation einer Rechteckfunktion

Die Fourier-Transformation einer eindimensionalen Rechteckfunktion soll hier als Beispiel dienen, mit dem die Beugung am Spalt beschrieben werden kann.

$$r(x) = \left\{ \begin{array}{l} 0 \text{ für } x < -\frac{b}{2} \\ D \text{ für } -\frac{b}{2} \le x \le \frac{b}{2} \\ 0 \text{ für } x > \frac{b}{2} \end{array} \right\}$$

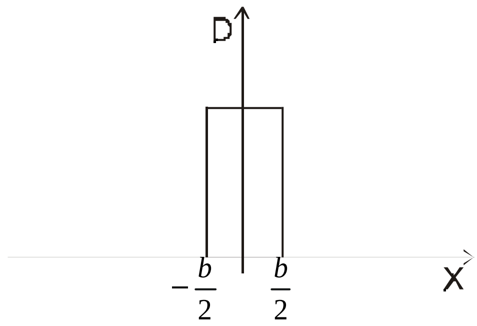


Abbildung 12: Das mathematische Modell für einen Spalt mit der Breite b und „Durchlässigkeit" D.

Die Fourier-Transformation der Dichte entspricht der Integration der Dichte des Objekts über den Ortsraum:

$$F(k) = \int_{Ortsraum} r(x) \cdot e^{i \cdot k \cdot x} dx = \int_{-b/2}^{b/2} D \cdot e^{i \cdot k \cdot x} dx \qquad [\,2.5\text{-}1\,]$$

Daraus folgt:

$$F(k) = \frac{D}{i \cdot k} \left[e^{i \cdot k \cdot x} \right]_{-b/2}^{+b/2} = \frac{D}{i \cdot k} \left[e^{i \cdot k \cdot \frac{b}{2}} - e^{-i \cdot k \cdot \frac{b}{2}} \right] \qquad [\,2.5\text{-}2\,]$$

Mit Hilfe des Terms

$$e^{i \cdot j} - e^{-i \cdot j} = \cos j + i \cdot \sin j - \cos(-j) - i \cdot \sin(-j) = 2 \cdot i \cdot \sin j \qquad [\,2.5\text{-}3\,]$$

berechnet man somit:

$$F(k) = \frac{D \cdot \sin(k/2 \cdot b)}{k/2} \qquad [\,2.5\text{-}4\,]$$

Der Imaginärteil entfällt, da der Spalt symmetrisch um die Null gelegt wurde. Quadriert man nun die Amplitude $F(k)$, so erhält man die Intensität:

$$I(k) = \left[\frac{D \cdot \sin(k/2 \cdot b)}{k/2} \right]^2 \qquad [\,2.5\text{-}5\,]$$

Wählt man $D = \frac{1}{b}$ und statt k den Ausdruck $k \cdot \sin q$, so erhält man:

$$\boxed{I(k) = \left[\frac{\sin(k \cdot b/2 \cdot \sin q)}{k \cdot b/2 \cdot \sin q} \right]^2} \qquad [\ 2.5\text{-}6\ ]$$

Man erkennt, daß die Formel des Intensitätsverlaufs der Fourier-Transformation eines Spaltes (Vgl. [2.5-6]) das gleiche Ergebnis liefert wie die ebenen, monochromatischen Wellen, die auf ein Hindernis mit einem Spalt treffen (Vgl. [2.2-7]). Daraus folgt, daß Beugung unter Fraunhofer‘schen Bedingungen, d.h. wenn sich Lichtquelle und Schirm in einem unendlichen Abstand von dem beugenden Objekt befinden, durch die Fourier-Transformation beschreibbar ist[27]. Im Nachfolgenden kann demnach die Betrachtung der Elementarwellen außer Acht gelassen werden. Das Beugungsbild unter Fraunhofer’schen Bedingungen ist die Fourier-Transformation des Ortsbildes. Von nun an werden Beugungserscheinungen daher in dieser Arbeit durch Fourier-Analyse ausgedrückt.

2.6 Beugung an kreisförmigen Öffnungen

Die Beugung an einer kreisförmigen Öffnung (mit dem Radius R) unter Verwendung monochromatischen Lichtes liefert ein Bild, das aus einem zentralen, hellen, kreisförmigen Scheibchen besteht, welches abwechselnd von dunklen und hellen Ringen umgeben ist. Die Abhängigkeit der gebeugten Intensität vom Richtungswinkel kann durch die Fourier-Transformation berechnet werden. Für Beugungsvorgänge z.B. an einer Lochblende muß die bisher beschriebene eindimensionale Fourier-Transformation auf die Zweidimensionalität ausgedehnt werden. Eine zweidimensionale Transformation erfolgt, indem man jeweils einmal über die beiden Dimensionen transformiert (Vgl. Kapitel 3.2). Die Definition einer solchen Lochblenden-Matrix weist innerhalb der kreisförmigen Blendenöffnung den Wert 1 und außerhalb die Null zu.

Das Ergebnis der zweidimensionalen Transformation liefert ein berechnetes Beugungsbild, bei dem folgende Abhängigkeit der Intensität des Bildes vom Richtungswinkel q besteht:

$$J_\theta \sim J_1^2\left(\frac{2\pi}{\lambda}R\sin\theta\right)/\left(\frac{2\pi}{\lambda}R\sin\theta\right)^2 \qquad [\,2.6\text{-}1\,]$$

Hierbei bedeutet J_1 die Besselfunktion erster Ordnung. Die Winkel $\theta_1, \theta_2, \theta_3 \ldots$, für die minimale Intensitäten auftreten, ergeben sich aus den tabellierten Nullstellen der Besselfunktion:

$$\sin\theta_1 = 0{,}610\frac{\lambda}{R}; \sin\theta_2 = 1{,}116\frac{\lambda}{R}; \sin\theta_3 = 1{,}619\frac{\lambda}{R} \ldots \qquad [\,2.6\text{-}2\,]$$

Dazwischen liegen die Maxima (die hellen Ringe) bei den Winkeln:

$$\sin\theta_1 = 0{,}819\frac{\lambda}{R}; \sin\theta_2 = 1{,}346\frac{\lambda}{R}; \sin\theta_3 = 1{,}850\frac{\lambda}{R} \ldots \qquad [\,2.6\text{-}3\,]$$

Diese beiden Formeln [2.6–2] und [2.6–3] entsprechen den Gleichungen [2.2–10] und [2.2–12] für den Spalt und sind analog aufgebaut.

Die Beugungserscheinung sieht also so aus, daß man statt eines Lichtpunktes, wie es die geometrische Abbildung fordern würde, eine helle Kreisfläche vom Radius $r_1 = 0{,}61\lambda/R$ erhält, deren Intensität vom Maximum bei $r = 0$ bis zum Wert 0 bei $r = r_1$ abnimmt. Dann folgt der erste dunkle Ring für $r = r_1$, dann ein heller Ring, der von den Radien r_1 und $r_2 = 1{,}116\lambda/R$ begrenzt wird. Bei $r = r_2$ liegt der zweite dunkle Ring usw.

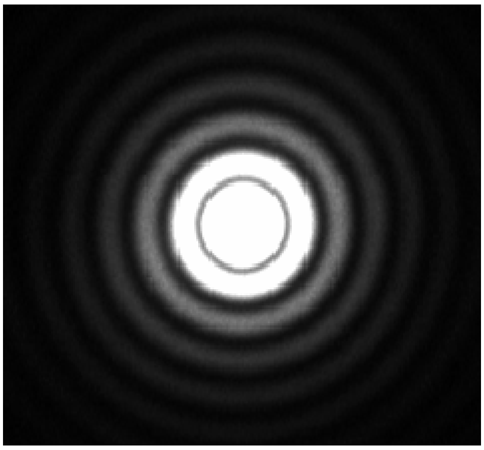


Abbildung 13: Beugungsbild bei der Beugung an einer kreisförmigen Öffnung.

Die zum Beugungsmuster gehörende Funktion lautet:

$$I(x) = \left[\frac{2J_1(x)}{x}\right]^2 \qquad [\,2.6\text{-}4\,]$$

Dies ist die normierte Intensität, deren erste Nullstelle bei $x = 3{,}832$ (Vgl. Winkelschreibweise in [2.6-2]) liegt. Im ersten Maximum sind 84% der Gesamtfläche der Funktion enthalten. Das kreisförmige Hauptmaximum nennt man auch das Airyscheibchen.

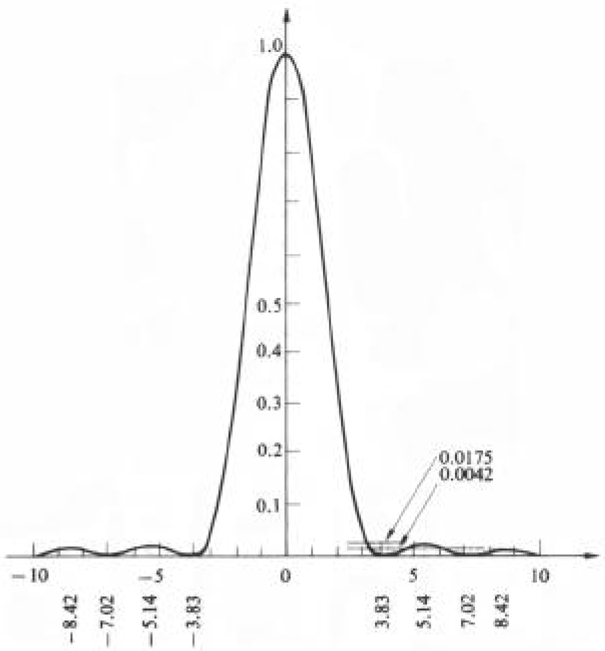


Abbildung 14: Graph der Funktion [2.6-4] (nach Hecht). Man spricht von der normierten Intensität.

Diese Funktion muß man sich auf Grund der axialen Symmetrie um die Intensitätsachse rotiert vorstellen:

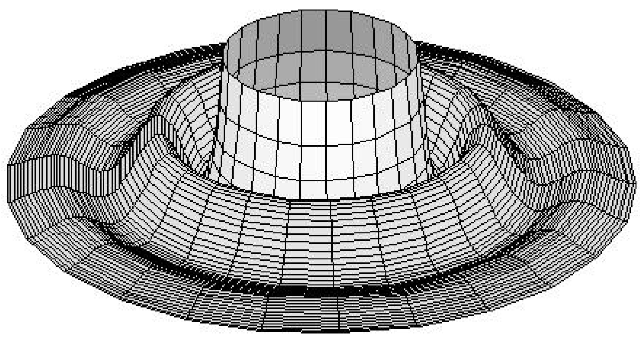


Abbildung 15: Intensitätsverteilung, die bei Fraunhofer'scher Beugung an einem kreisrunden Loch entsteht (Das zentrale Maximum ist nicht vollständig dargestellt.).

Beugungserscheinungen an kreisförmigen Öffnungen können ebenso auf kreisförmige Gegenstände übertragen werden. Dieses Phänomen beschreibt das Babinet'sche Theorem. Es besagt, daß komplementäre Schirme (d.h. Schirme, bei denen Öffnungen und undurchsichtige Partien vertauscht sind) außerhalb des Bereichs der geometrisch-optischen Abbildung (d.h. außerhalb des Primärstrahls) die gleichen Beugungserscheinungen liefern. Scheiben ergeben also die gleichen Beugungsfiguren wie gleich große Öffnungen.

Auf dem Schirm kann nur der Winkel und die Intensität $|A|^2 = I$ beobachtet werden, so daß dort keine Information über die Phase zu finden ist. Die Translation des Objekts ändert nur die Phase zwischen den Wellen, so daß sich das Beugungsbild selbst nicht verändert.

Bei größer werdender Zahl von Beugern kann der zentrale helle Fleck so hell werden, daß das Beugungsbild durch die Überstrahlungseffekte schwer zu beurteilen wird.

2.7 Fourier-Gesetze

Die allgemeinen Beziehungen der Fourier-Transformation lassen sich zum einen in optischen Versuchen physikalisch deuten, zum anderen liefern sie einige Regeln, die als Hilfsmittel für Berechnungen dienen und zum Verständnis der Fourier-Spektren verschiedener Beugungsstrukturen beitragen können.

Beugt man, in einem optischen Experiment durchgeführt, zwei Strukturen gleichzeitig, so ist diese Fourier-Transformation die Überlagerung der Transformierten der Einzelverteilungen.

Man spricht hier von der *Linearität* der Fourier-Transformation[28]:

$$\begin{aligned} &F[E_1(x,y)+E_2(x,y)](v_x,v_y) = \\ &F[E_1(x,y)](v_x,v_y)+F[E_2(x,y)](v_x,v_y) \end{aligned} \qquad [\ 2.7\text{-}1\ ]$$

Der *Verschiebungssatz* der Fourier-Transformation

$$\begin{aligned} &F[E(x+\Delta x,y+\Delta y)](v_x,v_y) = \\ &e^{2p\cdot i(v_x\Delta x+v_y\Delta y)}F[E(x,y)](v_x,v_y) \end{aligned} \qquad [\ 2.7\text{-}2\ ]$$

besagt dagegen, daß bei einer Verschiebung der beugenden Struktur in x- und y-Richtung um Δx bzw. Δy nur eine lineare Phasenverschiebung hinzugefügt wird. Das Beugungsbild, d.h. die Intensität des Amplitudenspektrums, ändert sich bei einer Verschiebung der beugenden Struktur nicht.

Ersetzt man beispielsweise einen einzigen kreisförmigen Beuger durch eine große Anzahl gleicher Beuger in regelloser Anordnung, so erhält man nahezu die gleiche Beugungsfigur wie mit dem einzelnen Gegenstand. Die Figuren aller Scheiben addieren sich praktisch ohne gegenseitige Beeinflussung, da der Gangunterschied aller Kombinationen verschieden ist. Daher überlagern sich Maxima und Minima der zusätzlichen Streifen. Wenn N zufällig verteilte Beuger von monochromatischem Licht beleuchtet werden, so ist die Flußdichteverteilung allerdings N mal so hell (Vgl. [3.3-13]). Zusätzlich wird im Zentrum ein heller Fleck auftreten, für den die Flußdichte N^2 mal so groß wie die von einem einzelnen Beuger kommende ist.

Eine weitere Regel stellt der *Ähnlichkeitssatz* der Fourier-Transformation dar:

$$F[E(ax,by)](v_x,v_y) = \frac{1}{|a|\cdot|b|} F[E(x,y)](\frac{v_x}{a},\frac{v_y}{b}) \qquad [\,2.7\text{-}3\,]$$

Eine Vergrößerung der Beugungsstruktur (z.B. eine Verbreiterung eines Spaltes oder hier die Vergrößerung des Kreisradius) hat in der Fourier-Ebene eine entsprechende Verkleinerung des Beugungsmusters zur Folge. Ebenso vergrößert sich das Beugungsmuster bei Verkleinerung der Vorlage. Diesen Sachverhalt hat bereits Formel [2.2-7] aufgezeigt.

Die Darstellung und Überprüfung der Fourier-Gesetze wird im experimentellen Vorgehen der Arbeit noch eine wichtige Rolle spielen.

3 Grundlagen zur Analyse der Größenverteilung

In diesem Kapitel werden die mathematischen Grundlagen entwickelt, die die Grundlage einer computergestützten Analyse bilden sollen, um die Größenverteilung der Beuger aus dem Beugungsbild zu bestimmen[29,30].

3.1 FFT-Algorithmus

Als FFT bezeichnet man die sogenannte **F**ast-**F**ourier-**T**ransformation. Es handelt sich um die Implementation eines schnellen Algorithmus zur Berechnung der Fourier-Transformation durch den Computer.

Analog zu [2.4-6] kann man die Fourier-Transformation auch diskret ausdrücken und mit F_n abkürzen:

$$F_n = \sum_{k=0}^{N-1} f_k \cdot e^{2 \cdot p \cdot i \cdot k \cdot n / N} \qquad [\,3.1\text{-}1\,]$$

Die inverse diskrete Fourier-Transformation, mit der die f_k-Werte wieder aus den N F_n-Werten bestimmt werden können, ist wie folgt gegeben:

$$f_k = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} F_n \cdot e^{-2 \cdot p \cdot i \cdot k \cdot n / N} \qquad [\,3.1\text{-}2\,]$$

Man erkennt hierbei, daß sich die inverse diskrete Fourier-Transformation nur in dem Vorfaktor $1/N$ sowie dem Vorzeichen des Exponenten von der diskreten Fourier-Transformation [3.1-1] unterscheidet. Dadurch kann ein Algorithmus, der für die diskrete Fourier-Transformation entwickelt wurde, auch gleichzeitig, wenn das Vorzeichen des Exponenten und der Skalierungsfaktor angepaßt werden, die inverse diskrete Fourier-Transformation berechnen.

Mit Hilfe der Abkürzung

$$W = e^{2 \cdot p \cdot i / N} \qquad [\,3.1\text{-}3\,]$$

kann die diskrete Fourier-Transformation wie folgt geschrieben werden:

$$F_n = \sum_{k=0}^{N-1} W^{k \cdot n} \cdot f_k \qquad [\,3.1\text{-}4\,]$$

Man erkennt, daß für die Berechnung einer Komponente F_n der diskreten Fourier-Transformation N Multiplikationen und N Additionen nötig sind. Da auch noch N Komponenten F_n berechnet werden müssen, zeigt sich, daß eine diskrete Berechnung nach [3.1-1] in $\boxed{O(N^2)}$ ablaufen würde. Vor allem in Hinblick auf die zweidimensionale Fourier-Transformation ist dies kein befriedigendes Ergebnis, da ein quadratischer Anstieg der Laufzeit besonders bei großen N stark ins Gewicht schlägt.

Abhilfe schafft hier das Prinzip Divide-And-Conquer (Teile und herrsche), bei dem man ein Problem immer wieder in identische kleinere Probleme aufteilt, bis es schließlich eine triviale Lösung gibt. Anschließend wird durch Zusammensetzen der Teilprobleme das ursprüngliche Problem gelöst. Danielson und Lanczos zeigten 1942 eine der einfachsten Ableitungen des FFT-Algorithmus auf. Herzstück dieser Ableitung ist die Aussage, daß die diskrete Fourier-Transformation der Länge N sich als Summe von zwei diskreten Fourier-Transformationen jeweils der Länge $N/2$ beschreiben läßt. Die eine Fourier-Transformation der Länge $N/2$ setzt sich aus den Punkten mit geradem Index der N-Originalpunkte zusammen, die andere aus den Punkten mit ungeradem Index. Die Aufteilung der FT in zwei Teilprobleme läßt sich folgendermaßen zeigen:

$$
\begin{aligned}
F_n &= \sum_{k=0}^{N-1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot k\cdot n/N}\cdot f_k \\
&= \sum_{k=0}^{\frac{N}{2}-1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot n\cdot(2k)/N}\cdot f_{2k} + \sum_{k=0}^{\frac{N}{2}-1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot n\cdot(2k+1)/N}\cdot f_{2k+1} \\
&= \sum_{k=0}^{\frac{N}{2}-1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot n\cdot k/\frac{N}{2}}\cdot f_{2k} + W^n \sum_{k=0}^{\frac{N}{2}-1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot n\cdot k/\frac{N}{2}}\cdot f_{2k} \\
&= F_n^e + W^n F_n^o \qquad \text{mit}\, W \equiv e^{2\cdot p\cdot i/N}
\end{aligned}
\qquad [\,3.1\text{-}5\,]
$$

F_n^e bezeichnet dabei die n-te Komponente der Fourier-Transformation der Länge $N/2$, die aus den Werten mit geradem (**e**ven) Index der N-Originaldaten gebildet wurde; F_n^o ist dementsprechend die Fourier-Transformation der Länge $N/2$, die aus den Werten mit ungeradem (**o**dd) Index gebildet wird. Das positive an dem Danielson-Lanczos Verfahren ist, daß man es rekursiv anwenden kann. Allerdings kommt hierbei die einzige Beschränkung der FFT gegenüber der diskreten FT ins Spiel: Die Anzahl N der diskreten Werte muß eine Potenz von 2 sein. Diese Beschränkung ist keine gravierende, da es einige Möglichkeiten gibt, dieses Problem zu relativieren. Eine davon ist, die fehlenden Daten bis zur nächsten Potenz von 2 symmetrisch um das Signal mit Nullen aufzufüllen.

Da nun das Problem der Berechnung von F_n auf die Bestimmung von F_n^e und F_n^o reduziert wurde, kann das gleiche Verfahren auf F_n^e angewendet werden, wodurch man die Fourier-Transformation F_n^{ee} und F_n^{eo} der Länge $N/4$ bestimmen muß. Dies führt man weiter bis die diskrete Fourier-Transformation eines Wertes bestimmt werden muß. Die diskrete Fourier-Transformation der Länge 1 ist genau die identische Abbildung. Es existiert also für jeden Wert f_k eine $\log_2(N)$ lange Folge von e's und o's der rekursiv erhaltenen 1-Punkt FFT:

$$F_n^{eoeeoeooe\cdots oeooe} = f_k \qquad \text{für ein bestimmtes } k \qquad [\,3.1\text{-}6\,]$$

Nun muß man noch feststellen, welche Folge der e's und o's in dieser Gleichung zu welchem k gehört. Kehrt man die Abfolge der e's und o's in der Gleichung um und setzt $e = 0$ und $o = 1$, so erhält man die binäre Darstellung von k. Damit läßt sich nun der FFT-Algorithmus formulieren:

Zuerst werden die N Originaldaten f_k so sortiert, daß sie der oben besprochenen Bit-Spiegelung entsprechen. Kombiniert man nun benachbarte Paare von Werten, so erhält man die 2-Punkte-Transformation, und kombiniert man wieder benachbarte Paare von Paaren, so erhält man die 4-Punkte-Transformation. Dies wird fortgeführt, bis schließlich die Kombination der ersten und zweiten Hälfte der Daten zur finalen Transformation, zur N-Punkte FFT führt. Jede Kombination benötigt N Rechenschritte, und es werden $\log_2(N)$ Kombinationen zur Berechnung der FFT durchgeführt, woraus sich eine Laufzeit des FFT-Algorithmus in $\boxed{O(N \cdot \log_2(N))}$ ergibt. Vergleicht man die Berechnung einer Fourier-Transformation von nur 1024 Punkten, so würde der Algorithmus mit der quadratischen Laufzeit schon etwa 100-mal länger dauern als der FFT-Algorithmus.

3.2 2D-FFT

Da nun eine effektive Methode aufgezeigt wurde, mit deren Hilfe sich die eindimensionale FFT berechnen läßt, kann analog hierzu die zweidimensionale diskrete FT formuliert werden. Sei $f(k_1,k_2)$ mit $k_1,k_2 \in \mathrm{N}_0^+$ und $N_1,N_2 \in \mathrm{N}_0^+$, $0 \le k_1 \le N_1 - 1$, $0 \le k_2 \le N_2 - 1$ eine komplexe Funktion, so kann man wie folgt ihre zweidimensionale diskrete FT angeben:

$$F(n_1,n_2) = \sum_{k_2=0}^{N_2-1} \sum_{k_1=0}^{N_1-1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot k_2\cdot n_2/N_2} e^{2\cdot p\cdot i\cdot k_1\cdot n_1/N_1} f(k_1,k_2) \qquad [\,3.2\text{-}1\,]$$

Die inverse zweidimensionale diskrete Fourier-Transformation ergibt sich ebenso analog zur eindimensionalen diskreten FT durch Änderung der Vorzeichen der i's und einer Skalierung mit dem Faktor $1/(N_1 \cdot N_2)$:

$$f(k_1,k_2) = \frac{1}{N_1 \cdot N_2} \sum_{n_2=0}^{N_2-1} \sum_{n_1=0}^{N_1-1} e^{-2\cdot p\cdot i\cdot k_2\cdot n_2/N_2} e^{-2\cdot p\cdot i\cdot k_1\cdot n_1/N_1} F(n_1,n_2) \qquad [\,3.2\text{-}2\,]$$

In Gleichung [3.2-1] erkennt man, daß man die Exponentialfunktion $e^{2\cdot p\cdot i\cdot k_2\cdot n_2/N_2}$ aus der Summe über die k_1 herausziehen kann. Dadurch wird ersichtlich, daß man die zweidimensionale diskrete FT einfach dadurch berechnen kann, daß man zuerst die FFT bezüglich k_1 berechnet und danach aus diesen Daten die FFT bezüglich der k_2 bestimmt - oder umgekehrt. Mit anderen Worten bedeutet dies:

Wenn man die Originaldaten $f(k_1,k_2)$ in N_1 Spalten und N_2 Zeilen organisiert, so erhält man die 2D-FFT dieser Daten, wenn man zuerst jede Spalte durch ihre FFT ersetzt und in den so erhaltenen Daten jede Zeile durch ihre FFT ersetzt. Die einzige Einschränkung ist wie bei der 1D-FFT, daß N_1 und N_2 eine Potenz von 2 sein müssen.

3.3 Beugung mehrerer gleichgroßer Beuger

Stellt man ein mathematisches Modell einer Lochblende mit dem Radius a auf, so sieht dieses folgendermaßen aus:

$$E(r,q)=E_0 r(r) \quad \text{mit} \quad r(r)=\begin{cases}1 & \text{für} \quad r\le a\\ 0 & \text{sonst}\end{cases} \qquad [\,3.3\text{-}1\,]$$

Deren Fourier-Transformation ist durch die Besselfunktion J_1 gegeben, und soll durch F_L abgekürzt werden.

$$F[E](n,f)=\frac{E_0 a}{n}J_1(2p\,na)=F_L(n,a) \qquad [\,3.3\text{-}2\,]$$

$$F[E](n_x,n_y)=\frac{E_0 a}{\sqrt{n_x^2+n_y^2}}J_1(2p\sqrt{n_x^2+n_y^2}\,a)=F_L(n_x,n_y) \qquad [\,3.3\text{-}3\,]$$

Über den Verschiebungssatz [2.7-2] der Fourier-Transformation läßt sich die Fourier-Transformierte einer Lochblende am Ort (x_j,y_j) beschreiben.

$$\begin{aligned}F[E(x+x_j,y+y_j)](n_x,n_y)&=e^{2\cdot p\cdot i\cdot(n_x x_j+n_y y_j)}F[E(x,y)](n_x,n_y)\\&=e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_j}F_L(n_x,n_y,a)\end{aligned} \qquad [\,3.3\text{-}4\,]$$

Wobei

$$d_j=d_j(n_x,n_y)=n_x,x_j+n_y,y_j \qquad [\,3.3\text{-}5\,]$$

gilt. Aufgrund der Linearität der Fourier-Transformation [2.7-1] kann man die Fourier-Transformierte von N zufällig an den Orten (x_j,y_j) verteilten Lochblenden ebenfalls angeben.

$$\begin{aligned}F[E](n,f)&=F_L(n,a)\left[e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_1}+e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_2}+\ldots+e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_N}\right]\\&=F_L(n,a)[\cos(2pd_1)+\ldots+\cos(2pd_N)\\&\quad+i\cdot(\sin(2pd_1)+\ldots+\sin(2pd_N))]\end{aligned} \qquad [\,3.3\text{-}6\,]$$

Die beobachtete Intensität im Beugungsbild entspricht bekanntlich dem Betragsquadrat der Fourier-Transformation.

$$|F[E](n,f)|^2=F_L(n,a)^2\left[\left(\sum_{j=1}^{N}\cos(2pd_j)\right)^2+\left(\sum_{j=1}^{N}\sin(2pd_j)\right)^2\right] \qquad [\,3.3\text{-}7\,]$$

Das Quadrat der Kosinus-Summe läßt sich folgendermaßen umformen:

$$\left(\sum_{j=1}^{N}\cos(2pd_j)\right)^2=\left(\sum_{j=1}^{N}\cos(2pd_j)\right)\left(\sum_{j=1}^{N}\cos(2pd_j)\right) \qquad [\,3.3\text{-}8\,]$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \cos(2pd_1)\cos(2pd_j) + \sum_{j=1}^{N} \cos(2pd_2)\cos(2pd_j) + \ldots$$

$$+ \sum_{j=1}^{N} \cos(2pd_N)\cos(2pd_j)$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \left[\sum_{k=1}^{N} \cos(2pd_j)\cos(2pd_k) \right]$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \cos^2(2pd_j) + \sum_{j=1}^{N} \sum_{k \neq j}^{N} \cos(2pd_j)\cos(2pd_k)$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \cos^2(2pd_j) + \sum_{j=1}^{N} \sum_{k \neq j}^{N} \frac{1}{2}\left[\cos(2p(d_j - d_k)) + \cos(2p(d_j + d_k))\right] \qquad [\,3.3\text{-}9\,]$$

Ebenso läßt sich das Quadrat der Sinus-Summe aus [3.3-7] umformen.

$$\left(\sum_{j=1}^{N} \sin(2pd_j) \right)^2 = \left(\sum_{j=1}^{N} \sin(2pd_j) \right)\left(\sum_{j=1}^{N} \sin(2pd_j) \right) \qquad [\,3.3\text{-}10\,]$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \sum_{k=1}^{N} \sin(2pd_j)\sin(2pd_k)$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \sin^2(2pd_j) + \sum_{j=1}^{N} \sum_{k \neq j}^{N} \sin(2pd_j)\sin(2pd_k)$$

$$= \sum_{j=1}^{N} \sin^2(2pd_j) + \sum_{j=1}^{N} \sum_{k \neq j}^{N} \frac{1}{2}\left[\cos(2p(d_j - d_k)) - \cos(2p(d_j + d_k))\right] \qquad [\,3.3\text{-}11\,]$$

Mit den Ergebnissen aus Gleichungen [3.3-9] und [3.3-11] läßt sich die Intensitätsverteilung des Beugungsbildes wie folgt angeben:

$$\left| F[E](n,f) \right|^2 = F_L(n,a)^2 \left[\left(\sum_{j=1}^{N} \cos(2pd_j) \right)^2 + \left(\sum_{j=1}^{N} \sin(2pd_j) \right)^2 \right] \qquad [\,3.3\text{-}12\,]$$

$$= F_L(n,a)^2 \left\{ \underbrace{\sum_{j=1}^{N} \left[\underbrace{\cos^2(2pd_j) + \sin^2(2pd_j)}_{1} \right]}_{N} \right.$$

$$\left. + \sum_{j=1}^{N} \sum_{K \neq j}^{N} \frac{1}{2} \left[2\cos(2p(d_j - d_k)) + \underbrace{\cos(2p(d_j + d_k)) - \cos(2p(d_j + d_k))}_{0} \right] \right\}$$

$$= F_L(n,a)^2 \left[N + \underbrace{\sum_{j=1}^{N} \sum_{K \neq j}^{N} \cos(2p(d_j - d_k))}_{\text{durch zirkuläre Mittelung} \approx 0} \right] \qquad [\,3.3\text{-}13\,]$$

Dies ist das berechnete Beugungsbild von N Beugern mit einem Radius a, die zufällig verteilt sind. Die Doppelsumme in dieser Gleichung [3.3-13] verursacht ein starkes Rauschen in den berechneten Beugungsbildern. Es kann durch eine zirkuläre Mittelung über das Beugungsbild nahezu komplett unterdrückt werden. Daher wurde in dem Programm die Funktion der zirkulären Mittelung integriert, bei der das Beugungsbild zirkulär analysiert (vom Mittelpunkt aus in 360°) und anschließend gemittelt wird. Nach der Mittelung ist der radiale Intensitätsverlauf des Beugungsbildes durch das N-fache des Intensitätsverlaufes des einzelnen Beugers $(F_L(n,a)^2)$ gegeben.

3.4 Beugung mehrerer verschieden großer Beuger

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, daß sich das Beugungsbild vieler Beuger einer Größe aus dem N-fachen des Beugungsbildes eines Beugers plus einem statistischen Rauschen zusammensetzt. Was aber mit Beugern unterschiedlicher Größe geschieht, soll in diesem Abschnitt untersucht werden. Dazu betrachtet man N_s Lochblenden mit einem Radius a_s und M verschiedenen Radien $(s=1,\cdots,M)$. Die Lochblenden befinden sich dabei an den zufällig verteilten Orten (x_j^s, y_j^s) mit $j=1,\cdots,N_s$. Für die Fourier-Transformierte ergibt sich aufgrund ihrer Linearität und des Verschiebungssatzes folgender Zusammenhang:

$$F[E](n,f) = F_L(n,a_1)\left[\sum_{j=1}^{N_1} e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_j^1}\right] + F_L(n,a_2)\left[\sum_{j=1}^{N_2} e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_j^2}\right]$$

$$+\cdots+F_L(n,a_M)\left[\sum_{j=1}^{N_M} e^{2\cdot p\cdot i\cdot d_j^M}\right] \qquad [3.4\text{-}1]$$

$$= \sum_{s=1}^{M} F_L(n,a_s)\sum_{j=1}^{N_s}\left[\cos(2p d_j^s) + i\cdot\sin(2p d_j^s)\right]$$

Für das Betragsquadrat der Intensität folgt dann:

$$\left|F[E](n,f)\right|^2 = \left(\sum_{s=1}^{M} F_L(n,a_s)\sum_{j=1}^{N_s}\cos(2pd_j^s)\right)^2 + \left(\sum_{s=1}^{M} F_L(n,a_s)\sum_{j=1}^{N_s}\sin(2pd_j^s)\right)^2 \qquad [\,3.4\text{-}2\,]$$

Das Quadrat der Summe über die Kosinusterme läßt sich weiterhin wie folgt umformen (F_{a_1} ist hier die Abkürzung für $F_L(n,a_1)$):

$$\left(\sum_{s=1}^{M} F_L(n,a_s)\sum_{j=1}^{N_s}\cos(2pd_j^s)\right)^2 \qquad [\,3.4\text{-}3\,]$$

$$= \sum_{k=1}^{N_1}\left[F_{a_1}^2\sum_{j=1}^{N_1}\cos(2pd_k^1)\cos(2pd_j^1) + F_{a_1}F_{a_2}\sum_{j=1}^{N_2}\cos(2pd_k^1)\cos(2pd_j^2) + \cdots + F_{a_1}F_{a_M}\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^1)\cos(2pd_j^M)\right]$$

$$+ \sum_{k=1}^{N_2}\left[F_{a_2}F_{a_1}\sum_{j=1}^{N_1}\cos(2pd_k^2)\cos(2pd_j^1) + F_{a_2}^2\sum_{j=1}^{N_2}\cos(2pd_k^2)\cos(2pd_j^2) + \cdots + F_{a_2}F_{a_M}\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^2)\cos(2pd_j^M)\right]$$

$$+ \cdots + \sum_{k=1}^{N_M}\left[F_{a_M}F_{a_1}\sum_{j=1}^{N_1}\cos(2pd_k^M)\cos(2pd_j^1) + F_{a_M}F_{a_2}\sum_{j=1}^{N_2}\cos(2pd_k^M)\cos(2pd_j^2) + \cdots + F_{a_M}^2\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^M)\cos(2pd_j^M)\right]$$

$$= F_{a_1}^2\sum_{k=1}^{N_1}\sum_{j=1}^{N_1}\cos(2pd_k^1)\cos(2pd_j^1) + F_{a_2}^2\sum_{k=1}^{N_2}\sum_{j=1}^{N_2}\cos(2pd_k^2)\cos(2pd_j^2) + \cdots + F_{a_M}^2\sum_{k=1}^{N_M}\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^M)\cos(2pd_j^M)$$

$$+ 2F_{a_1}F_{a_2}\sum_{k=1}^{N_1}\sum_{j=1}^{N_2}\cos(2pd_k^1)\cos(2pd_j^2) + \cdots + 2F_{a_1}F_{a_M}\sum_{k=1}^{N_1}\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^1)\cos(2pd_j^M)$$

$$+ 2F_{a_2}F_{a_3}\sum_{k=1}^{N_2}\sum_{j=1}^{N_3}\cos(2pd_k^2)\cos(2pd_j^3) + \cdots + 2F_{a_2}F_{a_M}\sum_{k=1}^{N_2}\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^2)\cos(2pd_j^M)$$

$$+ \cdots + 2F_{a_{M-1}}F_{a_M}\sum_{k=1}^{N_{M-1}}\sum_{j=1}^{N_M}\cos(2pd_k^{M-1})\cos(2pd_j^M)$$

$$= \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \cos^2(2p d_j^s) + \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k \neq j}^{N_s} \cos(2p d_j^s)\cos(2p d_k^s)$$

$$+ \; 2 \sum_{s=1}^{M-1} \sum_{t=s+1}^{M} F_{a_s} F_{a_t} \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k=1}^{N_t} \cos(2p d_j^s)\cos(2p d_k^t) \qquad [\,3.4\text{-}4\,]$$

Analog folgt für das Quadrat der Summe über die Sinusterme:

$$\left(\sum_{s=1}^{M} F_L(n, a_s) \sum_{j=1}^{N_s} \sin(2p d_j^s) \right)^2 \qquad [\,3.4\text{-}5\,]$$

$$= \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \sin^2(2p d_j^s) + \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k \neq j}^{N_s} \sin(2p d_j^s)\sin(2p d_k^s)$$

$$+ \; 2 \sum_{s=1}^{M-1} \sum_{t=s+1}^{M} F_{a_s} F_{a_t} \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k=1}^{N_t} \sin(2p d_j^s)\sin(2p d_k^t) \qquad [\,3.4\text{-}6\,]$$

Setzt man diese beiden Zwischenergebnisse [3.4-4] und [3.4-6] in den Ausdruck für die Intensität des Beugungsbildes [3.4-2] ein, so erhält man folgenden Zusammenhang:

$$\left| F[E](n,f) \right|^2$$

$$= \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \underbrace{\cos^2(2p d_j^s) + \sin^2(2p d_j^s)}_{=1}$$

$$+ \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k \neq j}^{N_s} \cos(2p d_j^s)\cos(2p d_k^s) + \sin(2p d_j^s)\sin(2p d_k^s)$$

$$+ 2 \sum_{s=1}^{M-1} \sum_{t=s+1}^{M} F_{a_s} F_{a_t} \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k=1}^{N_t} \cos(2p d_j^s)\cos(2p d_k^t) + \sin(2p d_j^s)\sin(2p d_k^t)$$

$$= \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \cdot N_s$$

$$+ \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k \neq j}^{N_s} \frac{1}{2} \Big[\cos(2p(d_j^s - d_k^s)) + \cos(2p(d_j^s + d_k^s))$$

$$+ \cos(2p(d_j^s - d_k^s)) - \cos(2p(d_j^s + d_k^s)) \Big]$$

$$+ 2 \sum_{s=1}^{M-1} \sum_{t=s+1}^{M} F_{a_s} F_{a_t} \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k=1}^{N_t} \frac{1}{2} \Big[\cos(2p(d_j^s - d_k^t)) + \cos(2p(d_j^s + d_k^t))$$

$$+ \cos(2p(d_j^s - d_k^t)) - \cos(2p(d_j^s + d_k^t)) \Big]$$

$$= \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \cdot N_s + \sum_{s=1}^{M} F_{a_s}^2 \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k \neq j}^{N_s} \cos(2p(d_j^s - d_k^s))$$
$$+ 2\sum_{s=1}^{M-1} \sum_{t=s+1}^{M} F_{a_s} F_{a_t} \sum_{j=1}^{N_s} \sum_{k=1}^{N_t} \cos(2p(d_j^s - d_k^t)) \quad [\,3.4\text{-}7\,]$$

Auch hier verschwinden die Summen über die Kosinusterme, wenn man die beobachtete Intensität der Beugungsbilder zirkulär mittelt, d.h. das gesamte Beugungsbild kreisförmig analysiert und anschließend mittelt. Für die zirkulär gemittelte Intensität $\overline{I(n, a_1, \cdots, a_M)}$ gilt damit genähert folgender Zusammenhang:

$$\boxed{\overline{I(n, a_1, \cdots, a_M)} \approx \sum_{s=1}^{M} F_L(n, a_s)^2 \cdot N_s} \quad [\,3.4\text{-}8\,]$$

Ist der gemittelte Intensitätsverlauf bekannt, gilt es die Anzahl N_s der Beuger der jeweiligen Größe a_s zu bestimmen. Dies kann durch eine Regression geschehen.

3.5 Regression

Man versucht bei einer Regression einen Satz von Punkten (x_i, y_i) mit $i = 1,2,\cdots,N$ durch ein Modell mit M anzupassenden Parametern anzunähern. Dieses Modell beschreibt einen funktionalen Zusammenhang zwischen den gemessenen unabhängigen und den abhängigen Variablen.

$$y(x) = y(x; c_1, \cdots, c_M) \quad [\,3.5\text{-}1\,]$$

Die Parameter $c_1, \cdots, c_M$ müssen nun optimiert werden, um den Verlauf der Daten (x_i, y_i) gut zu beschreiben. Eine gebräuchliche Möglichkeit hierzu ist die Minimierung des Fehlerquadrates, auch als *least-squares-fit*[31] bekannt:

$$\text{minimiere über } c_1, \cdots, c_M: \quad \sum_{i=1}^{N} \left[y_i - y(x_i; c_1, \cdots, c_M) \right]^2 \quad [\,3.5\text{-}2\,]$$

Der Hintergrund dieser Gleichung läßt sich über folgende Überlegung beschreiben: Betrachtet man die Wahrscheinlichkeit, daß ein gewisser Meßwert y_i im Intervall Δy über die Gleichung [3.5-1] erhalten wird. Dabei hängt die Wahrscheinlichkeit, daß der Wert y_i über [3.5-1] aus x_i

hervorgeht, stark von den Parametern $c_1,\cdots,c_M$ ab. Wählt man die Parameter $c_1,\cdots,c_M$ immer besser, so steigt auch die Wahrscheinlichkeit, daß der Wert y_i (im Intervall Δy) aus x_i hervorgeht. Ebenso sinkt die Wahrscheinlichkeit, wenn man die Parameter $c_1,\cdots,c_M$ so wählt, daß ein schlechter Fit der Funktion [3.5-1] entsteht.

Man kann die Parameter $c_1,\cdots,c_M$ also dadurch optimieren, daß man die Wahrscheinlichkeit, daß die Meßwerte y_i (mit $i=1,\cdots,N$) auftreten, maximiert. Wenn man nun annimmt, daß jeder Meßwert y_i einen unabhängigen zufälligen Meßfehler hat, und dieser Meßfehler einer Normalverteilung (Gaußverteilung) mit der Standardabweichung s_i um den wahren Wert $y(x_i)$ genügt, so kann die Wahrscheinlichkeit W, mit der die Meßwerte y_i auftreten, leicht angegeben werden. Die Wahrscheinlichkeit W des Datensatzes entspricht dann dem Produkt der Wahrscheinlichkeiten jedes einzelnen Punktes:

$$W \propto \prod_{i=1}^{N}\left\{\exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{y_i-y(x_i)}{s_i}\right)^2\right]\cdot\Delta y\right\} \qquad [\,3.5\text{-}3\,]$$

Eine Maximierung von [3.5-3] entspricht ebenfalls einer Maximierung des Logarithmus von [3.5-3] oder einer Minimierung des negativen Logarithmus.

$$-\ln\left[\prod_{i=1}^{N}\left\{\exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{y_i-y(x_i)}{s_i}\right)^2\right]\cdot\Delta y\right\}\right] \qquad [\,3.5\text{-}4\,]$$

$$=-\ln\left[\Delta y^N\cdot\exp\left[\sum_{i=1}^{N}-\frac{1}{2}\left(\frac{y_i-y(x_i)}{s_i}\right)^2\right]\right] \qquad [\,3.5\text{-}5\,]$$

$$=\left[\sum_{i=1}^{N}\frac{(y_i-y(x_i))^2}{2s_i^2}\right]-N\ln[\Delta y] \qquad [\,3.5\text{-}6\,]$$

Da s_i, N und Δy Konstanten sind, ist eine Minimierung von [3.5-6] äquivalent zu einer Minimierung des Fehlerquadrates in [3.5-2]. Man kann also eine Chi-Quadrat-Funktion definieren, deren Minimierung der Bestimmung der Parameter $c_1, \cdots, c_M$ entspricht.

$$c^2 = \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{y_i - y(x_i)}{s_i} \right)^2 \qquad [\,3.5\text{-}7\,]$$

Bei einer Minimierung von c^2 muß die Ableitung von c^2 nach den Parametern c_k verschwinden.

$$0 = \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{y_i - y(x_i)}{s_i} \right) \left(\frac{\partial y(x_i; \cdots c_k \cdots)}{\partial c_k} \right) \qquad \text{mit } k = 1, \cdots, M \qquad [\,3.5\text{-}8\,]$$

So erhält man einen Satz von M nichtlinearen Gleichungen um die M Parameter c_k zu bestimmen.

3.6 Lineare Regression

Bis jetzt wurden noch keine Einschränkungen für die Regressionsfunktion $y(x; c_1, \cdots, c_M)$ gemacht. Eine Einschränkung, die eine erhebliche Vereinfachung des Gleichungssystems [3.5-8] mit sich zieht, ist die lineare Regression. Dabei wird die Regressionsfunktion in der folgenden Form definiert:

$$y(x) = \sum_{k=1}^{M} c_k f_k(x) \qquad [\,3.6\text{-}1\,]$$

Die Funktionen $f_k(x)$ können dabei ohne Probleme nicht linear in x sein und werden als Basisfunktionen bezeichnet. Die Linearität der Regression bezieht sich dabei nur auf das lineare Auftreten der Regressionskoeffizienten c_k. Häufig werden als Basisfunktionen die Potenzen von x verwendet $(f_k(x) = x^{k-1})$, ebenso könnten aber auch Kosinus- und Sinus-Funktionen als Basisfunktionen dienen (z.B. $f_k(x) = \cos((k-1)x)$).

Wichtig ist nur, daß sich die Basisfunktionen in ihrem Verlauf charakteristisch voneinander unterscheiden.

Am besten sind dazu orthogonale Basisfunktionen geeignet. Mit dem Regressionsansatz [3.6-1] läßt sich dann die c^2-Funktion definieren, die es zu minimieren gilt.

$$c^2 = \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{y_i - \sum_{k=1}^{M} c_k f_k(x_i)}{s_i} \right)^2 \qquad [\,3.6\text{-}2\,]$$

Um die Funktion c^2 zu minimieren, existieren nun verschiedene Techniken, wobei auf die wichtigsten beiden eingegangen werden soll.

Zum einen existiert die Lösung über das sog. Normalgleichungs-System. Das Minimum von c^2 tritt auf, wenn die Ableitung von c^2 nach allen M Koeffizienten verschwindet. Setzt man den Ansatz von [3.6-1] in Gleichung [3.5-8], so erhält man M lineare Gleichungen:

$$0 = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{s_i^2} \left[y_i - \sum_{j=1}^{M} c_j f_j(x_i) \right] f_k(x_i) \qquad \text{mit } k = 1, \cdots, M \qquad [\,3.6\text{-}3\,]$$

Diese Gleichung [3.6-3] bezeichnet man als das Normalgleichungs-System des Regressionsproblems. Dieses Gleichungssystem kann über bestimmte Standard-Verfahren wie Gauß-Jordan-Elimination oder Dreieckszerlegung gelöst werden.

Leider sind die Verfahren der Gauß-Jordan-Elimination oder Dreieckszerlegung nur auf reguläre Gleichungssysteme anwendbar. In der Realität hat man es aber häufig mit Gleichungssystemen zu tun, die als singulär bezeichnet werden. Da bei diesen Systemen die oben angesprochenen Verfahren zur Lösung versagen oder ein falsches Ergebnis liefern, bietet ein weiteres Verfahren einen Ausweg. Man bezeichnet es als Singulärwertzerlegung (SVD; **S**ingular **V**alue **D**ecomposition)[29]. Dies ist heutzutage das Standard-Verfahren zur Lösung von linearen Regressionsproblemen und wird auch im Programm dieser Arbeit verwendet. Es liefert zwar nicht die exakte Lösung, stellt aber das beste Ergebnis im Sinne der Minimierung des Fehlerquadrates und der Lösung für die Regression dar.

3.7 Bestimmung der Größenverteilung

Vergleicht man den Ansatz der linearen Regression [3.6-1] mit dem Ergebnis der Überlagerung von radialsymmetrischen Beugern verschiedener Größe [3.4-8], so erkennt man, daß beide die gleiche Struktur besitzen. Man kann also mittels der linearen Regression versuchen, die Größenverteilung der Beuger aus einem Beugungsbild zu bestimmen. Dazu verwendet man als Basisfunktion die radiale Intensitätsverteilung $\left|F_L(n, a_s)\right|^2$ eines einzelnen Beugers mit den verschiedenen Radien a_s. Die weiteren Ausführungen hierzu folgen im Kapitel Ergebnisse der Computersimulation.

4 Ergebnisse der Computersimulation

Das verwendete Computerprogramm[32] ist in der Sprache Delphi für einen PC mit Windows 98 als Betriebssystem programmiert und ermöglicht die Simulation von Beugungsbildern, wie sie in der Fourier-Optik auftreten. Das Verhalten der Beugungsbilder wird untersucht, wenn man Größe, Anzahl und Position der Beuger verändert. Im zweiten Teil des Kapitels werden die Ergebnisse des Verfahrens dargestellt, mit dem aus einem simulierten Beugungsbild mittels linearer Regression die Größenverteilung der Beuger bestimmt werden kann. Schließlich wird noch ein verbessertes Erythrozytenmodell entwickelt.

4.1 Simulation von Beugungsbildern

Da es sich bei Erythrozyten normalerweise um kreisförmige Zellen handelt, kann man sie näherungsweise als Kreisscheiben darstellen. Die typischen Oberflächeneigenschaften der bikonkaven Zellen müssen zunächst abstrahiert betrachtet werden. Wird ein verdünnter Tropfen Blut auf einen Objektträger gebracht, sind das Resultat weitgehend kreisförmige, zufällig verteilte Erythrozyten, die sich fast ohne Überlagerung in einer horizontalen Ebene orientieren. Nähert man einen Erythrozyten numerisch durch einen gefüllten Kreis an, entspricht dies einer undurchsichtigen Scheibe als beugende Struktur. Ebenso könnte man sich auch vorstellen, die Kreisfläche ließe das einfallende Licht hindurch, wobei der umliegende Bereich lichtundurchlässig wäre. Dies entspricht einer Invertierung des Bildes. Beide Modelle liefern wie bereits besprochen die gleichen Ergebnisse (Vgl. Babinet'sches Theorem, Kapitel 2.6).

Das folgende Bild zeigt einen idealisierten Erythrozyten als kreisförmige, optisch homogene, zweidimensionale Struktur. Dieser befindet sich in einem quadratischen Bildausschnitt, was eine Bedingung der mathematischen Fast-Fourier-Transformation ist ($2^n \cdot 2^n$ Punkte). Daneben sieht man das dazugehörige berechnete Beugungsbild.

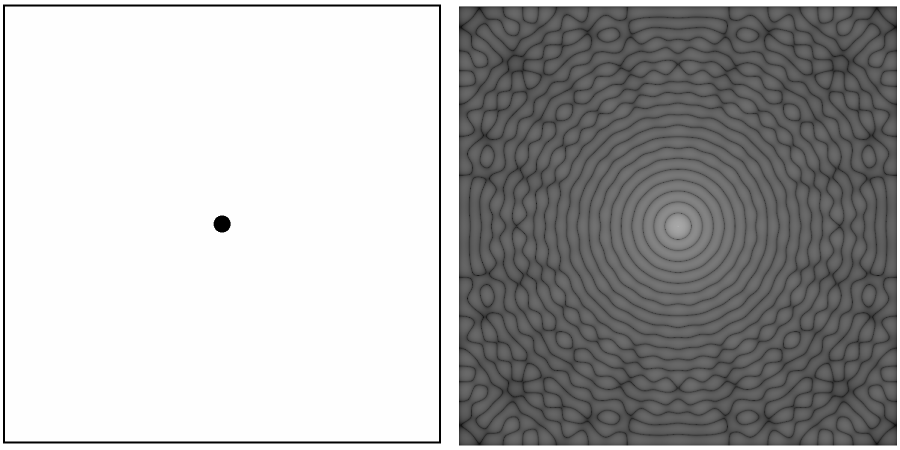


Abbildung 16: Originalbild und Beugungsbild eines Beugers mit dem Radius a=20 in einem quadratischen Bildausschnitt.

Zuerst muß überprüft werden, ob die Annahme bezüglich der Invertierung des Originalbildes zutrifft. Dazu wird ein Beuger mit einem Radius $a = 20$ Pixel verwendet (Vgl. Abbildung 16). Die FFT-Größe liegt bei 1024 x 1024 Punkten. In dem Beugungsbild - wie auch in allen folgenden - wurde zur besseren Darstellung der feinen Strukturen der Logarithmus der Intensität dargestellt, da das Betragsquadrat der Intensität der FFT $\left|F(n_x, n_y)\right|^2$ über mehrere Zehnerpotenzen schwankt. Im Vergleich zu Abbildung 16 ist in Abbildung 17 dasselbe Quellbild - nur invertiert (als Lochblende mit dem Radius $a = 20$ Pixel) - mit seinem resultierenden Beugungsbild dargestellt.

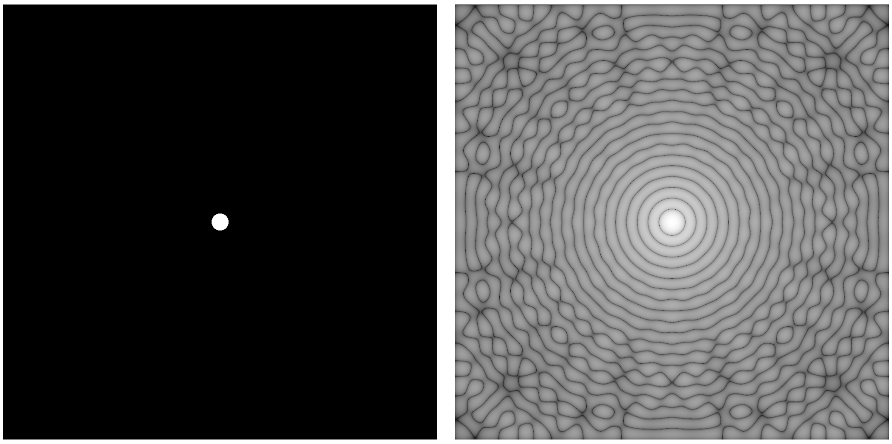


Abbildung 17: Originalbild und Beugungsbild einer Lochblende mit dem Radius a=20 Pixel.

Auf den ersten Blick wirkt das Beugungsbild heller, obwohl die Strukturen in beiden Beugungsbildern gleich erscheinen. Eine Erklärung hierfür ist die, daß bei der Kreisscheibe mehr Licht ungebeugt als bei der Lochblende transmittiert wird. Diese Intensität schlägt sich in der Komponente der (hier so bezeichneten) Nullfrequenz $n_0 = 0$ nieder. Vergleicht man die Intensitätsverläufe der beiden Beugungsbilder jeweils in einem horizontalen Schnitt durch den Mittelpunkt, so erkennt man, daß diese sich nur in einem Wert im Zentrum des Beugungsbildes unterscheiden.

Man kann das Beugungsbild der Kreisscheibe also durch das der Lochblende annähern, wenn man die Nullfrequenz $n_0 = 0$ außer acht läßt.

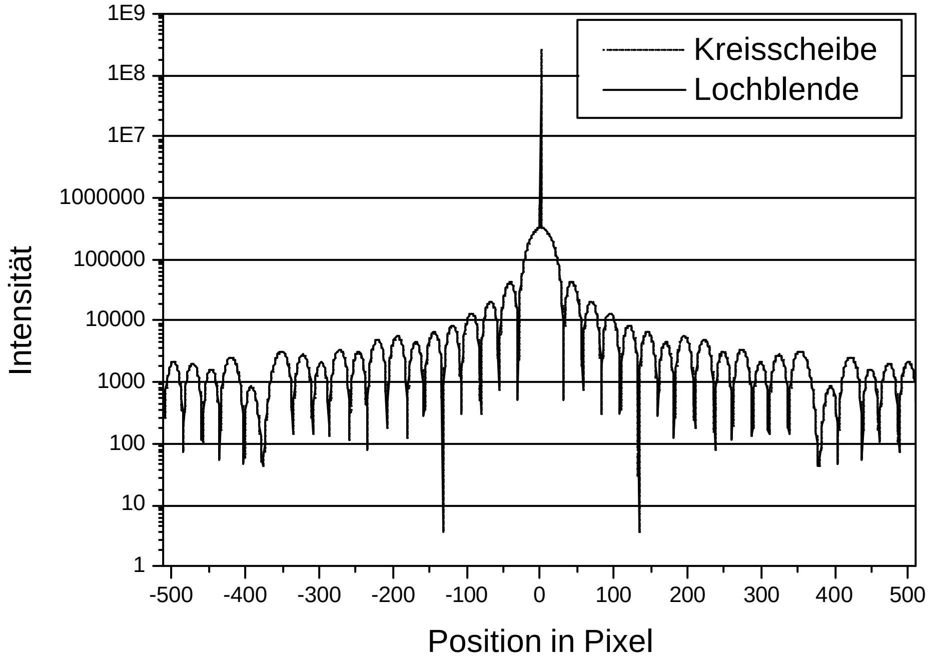


Abbildung 18: Verlauf der Intensität des Beugungsbildes der Kreisscheibe und der Lochblende.

Zusätzlich fällt bei den Beugungsbildern auf, daß sie nur in der inneren Hälfte dem erwarteten Verlauf der Besselfunktion entsprechen. Zum Rand hin treten selbstähnliche Figuren auf, die durch numerische Effekte der diskreten Fourier-Transformation und die quadratische Wahl der Datengrundlage hervorgerufen werden. Dies fällt auch beim Intensitätsverlauf in Abbildung 18 auf, da der Intensitätsverlauf zum Rand hin nicht immer der Besselfunktion entspricht. Diesen Effekt kann man aber durch zirkulares Mitteln um den Mittelpunkt etwas unterdrücken. Die Beugungsbilder sind sowohl in der Horizontalen als auch in der Vertikalen spiegelsymmetrisch. Daher werden für die Darstellung nur die Werte vom Mittelpunkt bis zum Rand gewählt. In Abbildung 19 sind einmal der Intensitätsverlauf für $n_y = 0, n_x \geq 0$ als Querschnitt und einmal zirkular gemittelt dargestellt.

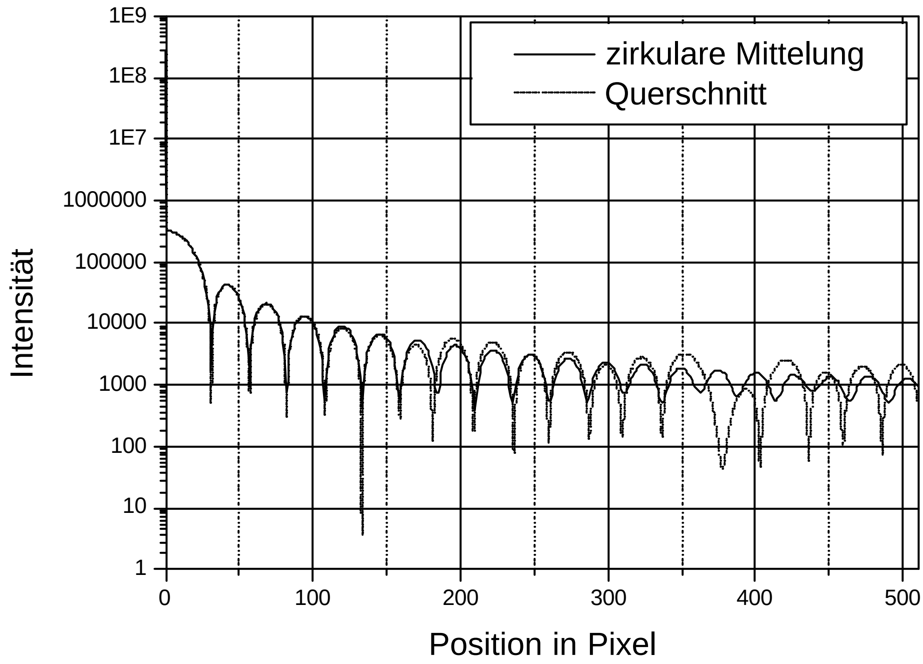


Abbildung 19: Vergleich der Intensitäten eines horizontalen Schnittes durch das Beugungsbild einer Kreisscheibe mit dem Radius a=20 Pixel und eines zirkular gemittelten Verlaufes der Intensität.

Zusätzlich kann durch zirkulare Mittelung auch der Effekt des Untergrundrauschens bei statistisch verteilten Beugern unterdrückt werden. In Abbildung 20 und Abbildung 21 sind zwei Quell- und Beugungsbilder von 50 bzw. 100 statistisch verteilten Beugern dargestellt. Man erkennt, daß die Beugungsbilder stark verrauscht sind. Dieses Rauschen entsteht durch die Überlagerung von Phasenthermen, die durch den Verschiebungssatz (Vgl. [2.7-2]) der komplexen Fourier-Transformation hervorgerufen werden. Daß hierbei eine Störung durch Rauschen und nicht durch eine Struktur entsteht, liegt daran, daß die Beuger im Quellbild zufällig verteilt sind. Wären die Beuger regelmäßig angeordnet, so entstünde durch diese Regelmäßigkeit ein zusätzlicher Frequenzeffekt. Das starke Rauschen macht sich auch bei einem Querschnitt entlang der n_x-Achse des Beugungsbildes bemerkbar.

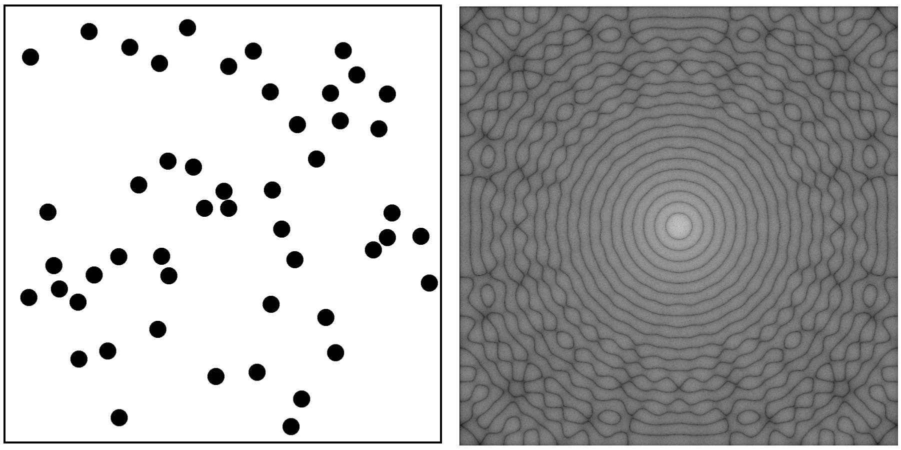


Abbildung 20: Quellbild und Beugungsbild von 50 statistisch verteilten Beugern mit Radius a=20 Pixel.

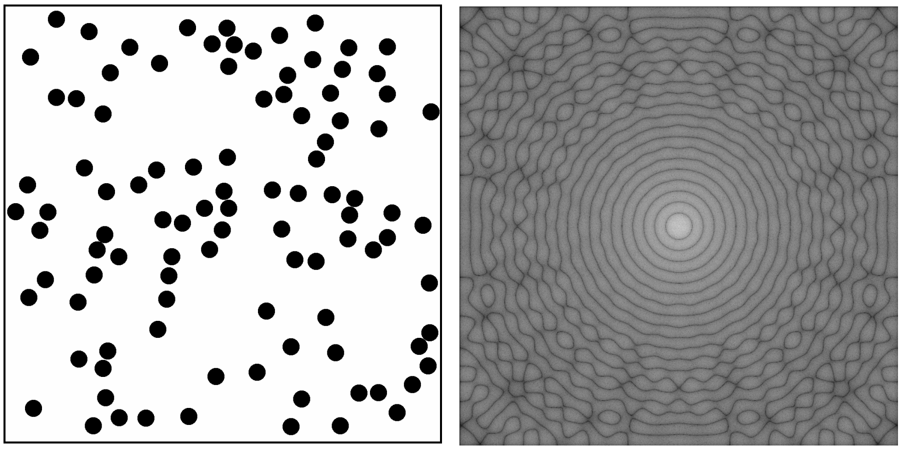


Abbildung 21: Quellbild und Beugungsbild von 100 statistisch verteilten Beugern mit Radius a=20 Pixel.

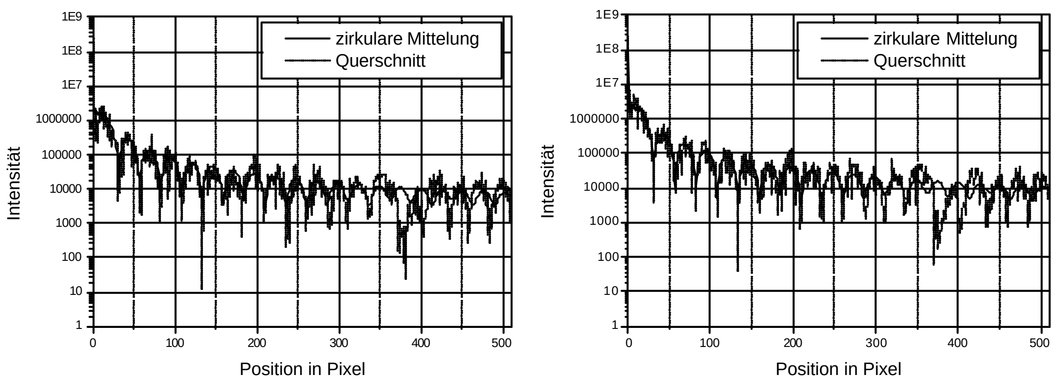


Abbildung 22: Intensitätsverläufe bei 50 statistisch verteilten Beugern (links) und 100 statistisch verteilten Beugern (rechts), Radien jeweils a=20 Pixel.

In Abbildung 22 ist links der Querschnitt durch das Beugungsbild von 50 statistisch verteilten Beugern und rechts von 100 Beugern dargestellt. Zusätzlich werden auch die zirkular gemittelten Werte aufgetragen.

Es läßt sich gut erkennen, daß man durch die Methode der zirkularen Mittelung aus den verrauschten Beugungsbildern mehrerer gleichgroßer Beuger wieder den charakteristischen Intensitätsverlauf der Beugungsobjekte erhalten kann. Im Folgenden werden die Intensitätsverläufe daher immer zirkular gemittelt dargestellt.

Nun soll der Einfluß der Position eines einzelnen Beugers im Quellbild auf das berechnete Beugungsbild untersucht werden. Es zeigt sich, daß alle Positionen eines Beugers der gleichen Größe zu dem gleichen Beugungsbild führen, wie es in Abbildung 16 und in Abbildung 23 dargestellt ist. Der Verschiebungssatz (Vgl. [2.7-2]) der Fourier-Transformation kann also leicht verifiziert werden.

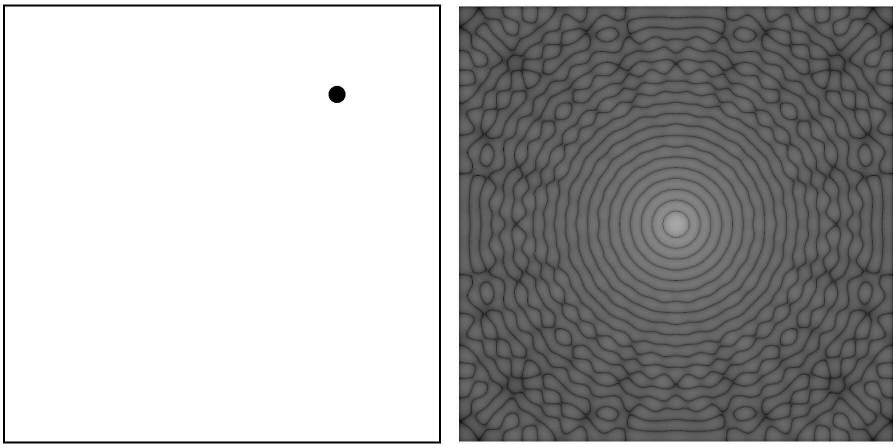


Abbildung 23: Originalbild und Beugungsbild eines verschobenen Beugers mit dem Radius a=20.

Als nächstes soll der Einfluß der Beugergröße auf die Form des Beugungsbildes untersucht werden. Hierzu werden jeweils eine Fourier-Transformation einer Kreisscheibe mit dem Radius a=20 und a=22 Pixel berechnet. Zur Orientierung bei der Interpretation des Beugungsbildes kann man gut das erste Minimum verwenden. Vergleicht man die beiden zirkular gemittelten Transformationen, so erkennt man, daß der Beuger von 22 Pixel Radius wie erwartet ein kleineres erstes Minimum der FFT liefert als der von 20 Pixel Radius. Hier bestätigt der Versuch einen weiteren Grundsatz der Fourier-Transformation, nämlich den o.g. Ähnlichkeitssatz (Vgl. [2.7-3]). Demnach hat eine Vergrößerung der Beugungsstruktur in der Fourier-Ebene eine entsprechende Verkleinerung des Beugungsmusters zur Folge. Umgekehrt vergrößert sich das Beugungsmuster bei Verkleinerung der Vorlage.

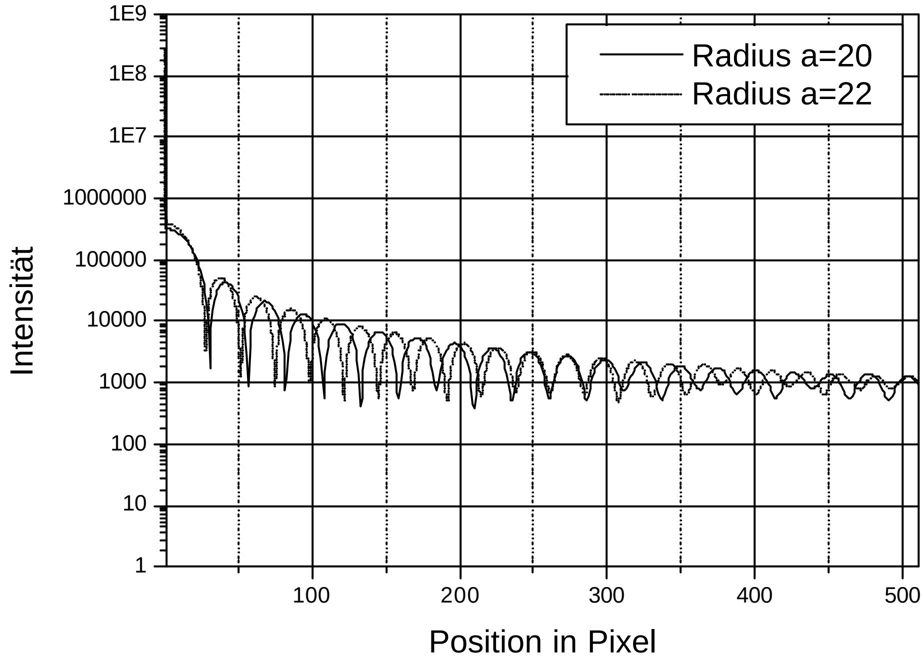


Abbildung 24: Vergleich der Beugungsbilder zweier kreisförmiger Beuger unterschiedlicher Größe.

In Abbildung 25 ist der zirkular gemittelte Intensitätsverlauf eines Beugers mit variablem Radius r dargestellt. Hier wurde der Radius der einzelnen Beuger immer verdoppelt ($r' = a \cdot r,\ a = 2$). Anhand der Lage der Minima kann man erkennen, daß das Beugungsbild mit $1/a$ skaliert wird, was aber noch näher untersucht werden soll.

Im nächsten Schritt wird daher die mathematische Abhängigkeit des ersten Minimums von verschiedenen Beugerradien ermittelt. In dem FFT-Programm werden Beuger von 4 bis 40 Pixel Radius erzeugt und transformiert. Das erste Minimum wird nun in der Datenmatrix manuell ermittelt und in der folgenden Grafik dargestellt. Da Computer mit quadratischen Pixels arbeiten, sind die Ergebnisse der Beuger kleiner als 4 Pixel Radius hier nicht verwertbar, denn der so erzeugte Beuger nähert sich mit kleiner werdendem Radius immer mehr einem Quadrat an (r=1) und entfernt sich von der Kreisform (r=∞). Daher sind nur Radien ab 4 Pixel erfaßt worden. Die Bildgröße beträgt erneut 1024 mal 1024 Pixel.

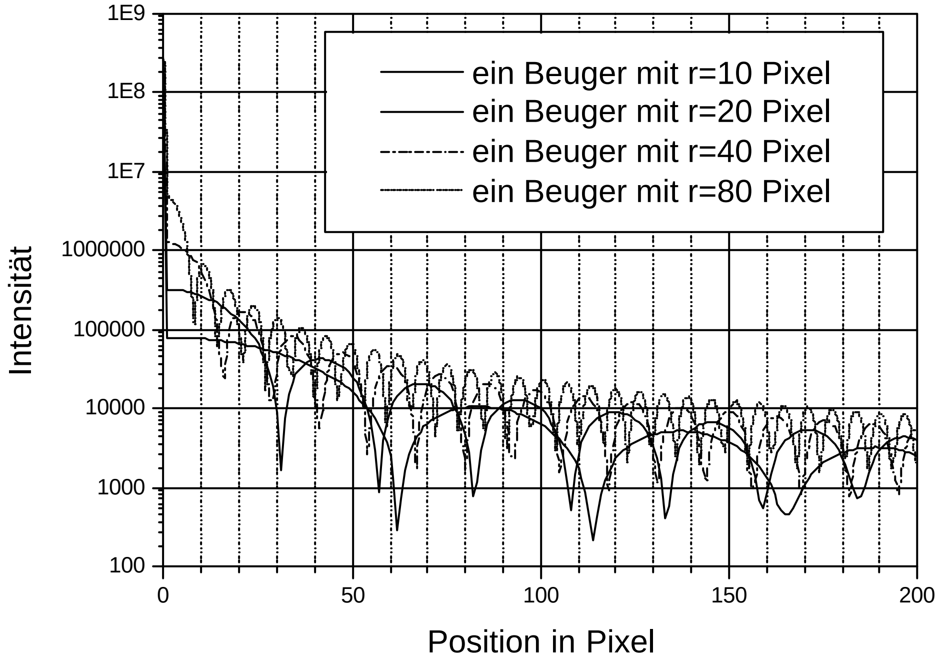


Abbildung 25: Zirkular gemittelter Intensitätsverlauf eines Beugers mit variablem Radius r.

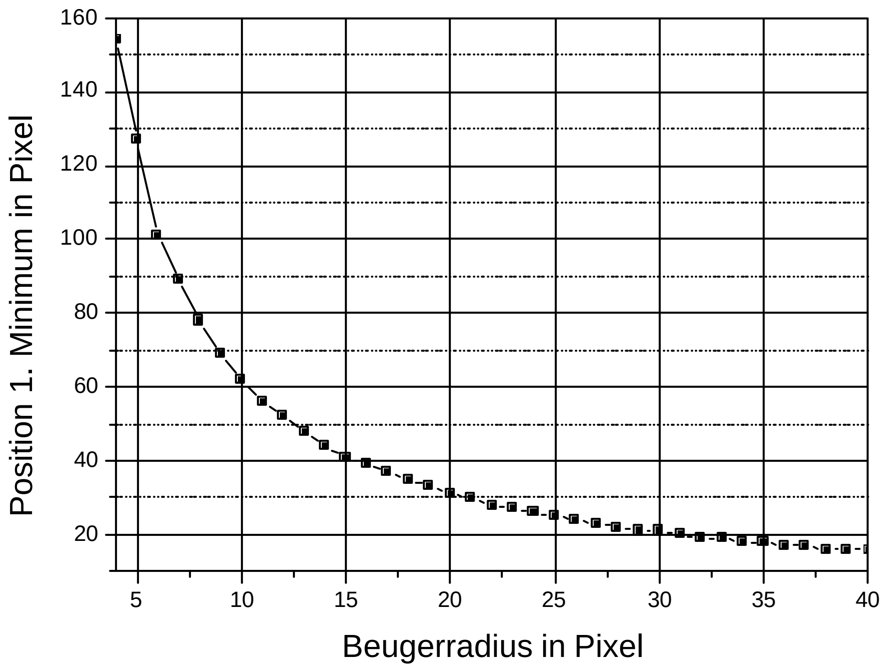


Abbildung 26: Position des ersten Minimums der FFT in Abhängigkeit des Beugerradius.

Jetzt kann man eine mathematische Abhängigkeit formulieren. Bei 1024 mal 1024 Pixel Bildgröße wird für die Hyperbel die folgende Formel empirisch aufgestellt.

$$\text{Position 1. Minimum} = \frac{622}{\text{Beugerradius}} \qquad [\,4.1\text{-}1\,]$$

Die berechneten Positionen erhält man dann in der Einheit Pixel vom Mittelpunkt entfernt. Das Experiment zeigt hier eine vergleichbare Gesetzmäßigkeit wie Formel [2.6-2] auf. Entsprechend der Abbildung 26 wird die Annahme bezüglich einer $1/a$-Skalierung also bestätigt und erklärt den hyperbolischen Kurvenverlauf.

Die Linearität (Vgl. [2.7-1]) der Fourier-Transformation kann experimentell in dem FFT-Programm evaluiert werden, indem man zunächst mehrere Beuger gleicher Größe in einem Bild erzeugt, dieses dann transformiert und das Ergebnis mit dem eines einzelnen Beugers dieser Größe vergleicht. Durch eine größere Anzahl der Beuger wird die Kurve des Intensitätsverlaufes nach oben verschoben. In Abbildung 27 sind die zirkular gemittelten Intensitätsverläufe unterschiedlicher Anzahlen von Beugern gleicher Größe dargestellt.

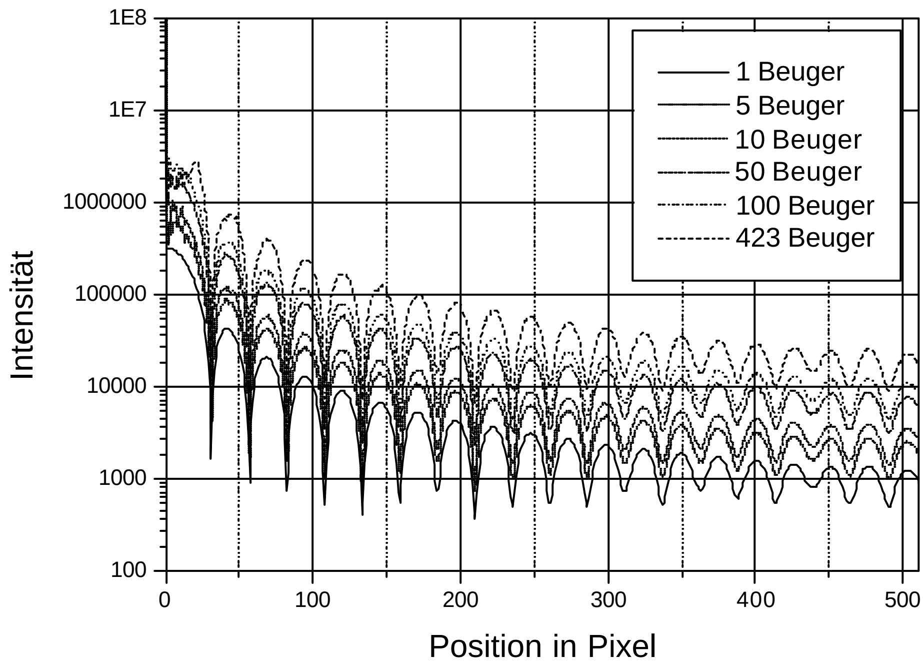


Abbildung 27: Zirkular gemittelte Intensitätsverläufe unterschiedlicher Anzahlen von Beugern mit dem Radius a=20.

Deutlich erkennt man bei einer Verzehnfachung der Anzahl von Beugern eine konstante Verschiebung in der logarithmischen Auftragung der Kurve, ohne daß sich die Positionen der Minima und Maxima ändern. Durch die gleichzeitige Beugung mehrerer Kreisscheiben kommt es zu einer Intensitätszunahme, was für die Linearität der Fourier-Transformation spricht.

4.2 Bestimmung der Größenverteilung

Zur Berechnung der Beugungsbilder durch die 2D-FFT werden im folgenden Bilder der Größe 1024 x 1024 Pixel verwendet. Um die Basisfunktionen zu bestimmen, werden zunächst die Beugungsbilder von Lochblenden mit einem Radius $a_s = 10{,}11{,}12,\cdots,40$ Pixels berechnet. Aus diesen Beugungsbildern wird dann mittels zirkularer Mittelung die Intensitätsverteilungen $F_L(n, a_s)$ mit $n = 0{,}1{,}2,\cdots,511$ und $a_s = 10{,}11{,}12,\cdots,40$ bestimmt. Als Design-Matrix der linearen Regression ergibt sich dann:

$$A = \begin{pmatrix} F_L(v_1,a_1)^2 & F_L(v_1,a_2)^2 & \cdots & F_L(v_1,a_M)^2 \\ F_L(v_2,a_1)^2 & F_L(v_2,a_2)^2 & \cdots & F_L(v_2,a_M)^2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ F_L(v_N,a_1)^2 & F_L(v_N,a_2)^2 & \cdots & F_L(v_N,a_M)^2 \end{pmatrix} \qquad [\,4.2\text{-}1\,]$$

Ebenso ergibt sich durch zirkulare Mittelung die beobachtete Intensität $|F(n)|^2$ aus dem Beugungsbild mit der unbekannten Größenverteilung. Damit ergibt sich für den Lösungsvektor $\vec{b}$ und den Koeffizientenvektor $\vec{c}$:

$$\vec{b} = \begin{pmatrix} |F(n_1)|^2 \\ |F(n_2)|^2 \\ \vdots \\ |F(n_N)|^2 \end{pmatrix} \qquad \vec{c} = \begin{pmatrix} N_{a_1} \\ N_{a_2} \\ \vdots \\ N_{a_M} \end{pmatrix} \qquad [\,4.2\text{-}2\,]$$

Nun kann man eine lineare Regression durchführen, um den Koeffizientenvektor $\vec{c}$ und damit die relative Anzahl der Beuger mit dem Radius a_s zu bestimmen. Es empfiehlt sich hierbei allerdings, als Datengrundlage nur die Meßwerte mit $n > 200$ Pixels zu verwenden. Dies liegt daran, daß sich bei der linearen Regression die Basisfunktionen signifikant von einander unterscheiden müssen. Vergleicht man die

Verläufe zweier Funktionen $F_L(n, a_s)$, bei denen sich der Radius a_s nur um einen Pixel unterscheidet (z. B. 10 und 11 Pixel), so erkennt man, daß erst ab $n = 200$ Pixel ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Funktionen entsteht. Es steht ein Minimum einem Maximum gegenüber.

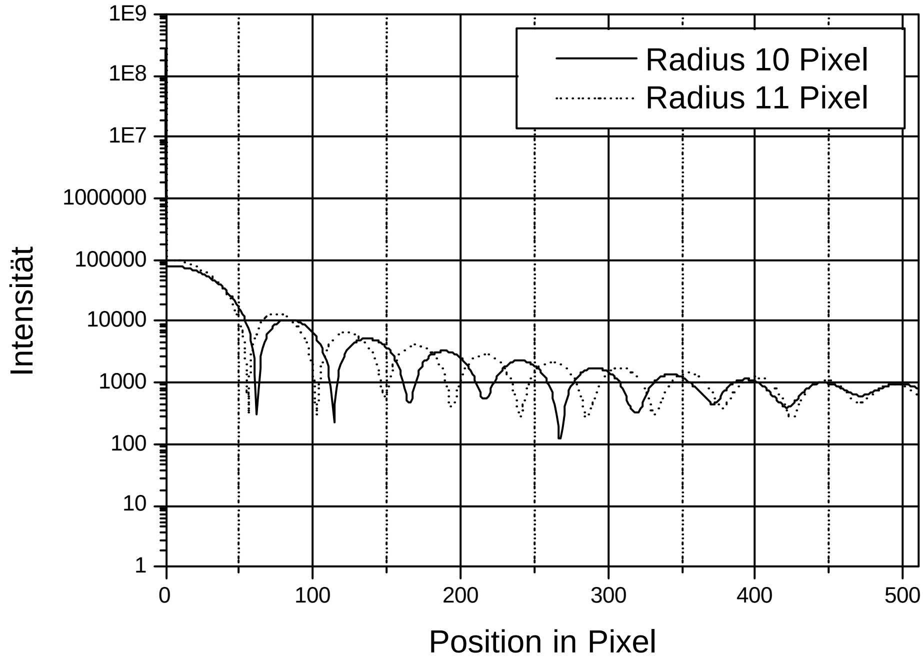
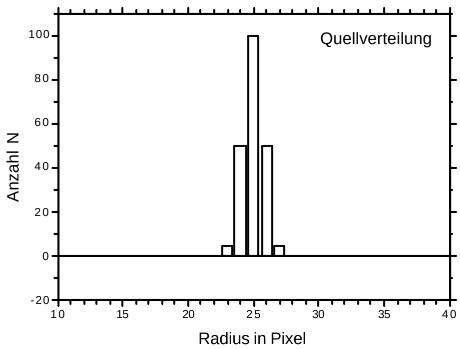


Abbildung 28: Verläufe der zirkular gemittelten Intensitäten bei einer Lochblende mit einem Radius von 10 bzw. 11 Pixels.

Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 29 die Quellverteilung und die Größenverteilung, die über die Regression aus dem Beugungsbild bestimmt wurde, dargestellt. Die Regression wurde dabei über die Punkte $n = 200 \cdots 500$ Pixel durchgeführt.



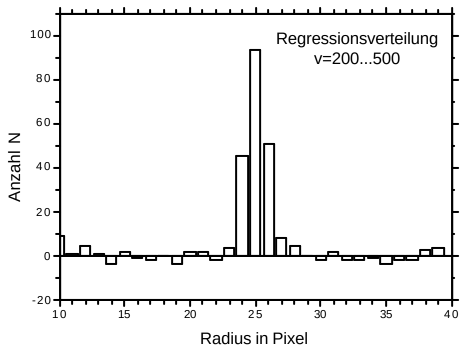


Abbildung 29: Links ist die Quellverteilung und rechts die durch Regression bestimmte Verteilung dargestellt. Die Regression wurde über die Punkte $n = 200 \cdots 500$ *Pixel durchgeführt.*

Zum Vergleich sind in Abbildung 30 zwei Ergebnisse der Regressionen dargestellt, die über einen größeren Wertebereich durchgeführt werden. Links werden fast alle Punkte ($n = 1 \cdots 500$ Pixel) als Grundlage für die Regression verwendet, rechts sind es die Punkte $n = 100 \cdots 500$ Pixel.

Man erkennt hier einen Nachteil der Bestimmung der Größenverteilung mittels linearer Regression. Als Lösung sind nämlich auch negative Koeffizienten N_s möglich, was in der Realität nicht möglich ist. Abhilfe könnte ein Regressionsansatz mit quadratischen Koeffizienten $n_s^2 = N_s$ schaffen. Allerdings ist dann ein Verfahren für eine nichtlineare Regression nötig.

Im folgenden wird aber das Verfahren der linearen Regression angewandt und gezeigt, daß man bei Begrenzung des Parameterbereichs für n auf etwa 200 bis 500 Pixel recht akzeptable Ergebnisse erhalten kann (Vgl. Abbildung 29).

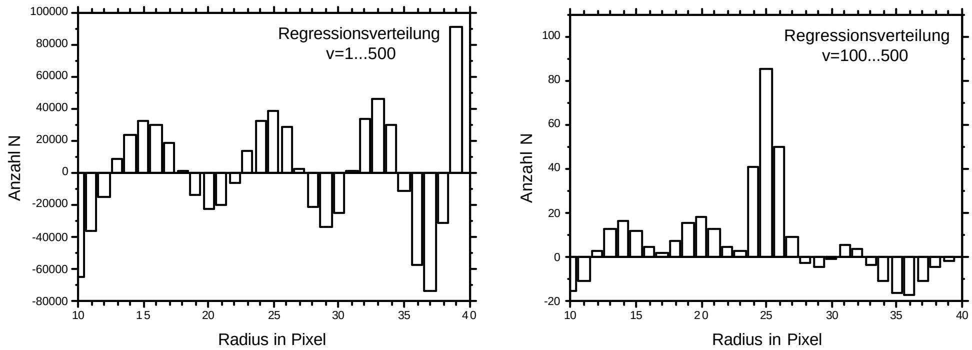


Abbildung 30: Links ist die Größenverteilung, die mittels Regression über die Punkte $n = 1 \cdots 500$ Pixel ermittelt wurde, und rechts die, die über die Punkte $n = 100 \cdots 500$ Pixel ermittelt wurde, dargestellt. Man erhält deutlich schlechtere Ergebnisse als über die Punkte $n = 200 \cdots 500$ Pixel (Vgl. Abbildung 29).

4.2.1 Variation des Mittelwertes der Größenverteilung

Es soll zunächst gezeigt werden, wie sich eine Variation des Mittelwertes der Größenverteilung auf die Regression auswirkt. Die Form der Größenverteilung bleibt hierbei unverändert. Zur Evaluation des Ergebnisses wird der mittlere Fehler als die mittlere absolute Abweichung der regressierten Größenverteilung von der Quellverteilung definiert. Der normierte mittlere Fehler erhält man, indem man das Integral über die durch die Regression bestimmte Größenverteilung auf die Gesamtzahl der Beuger der Quellverteilung normiert.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dargestellt. In jeder Abbildung ist oben links die Quellverteilung dargestellt. Oben rechts ist die zirkular gemittelte Intensitätsverteilung des Beugungsbildes dargestellt, die in die Regression eingeht. Unten links ist das Ergebnis einer einzelnen Regression, die über den Wertebereich $n = 200 \rightarrow 500$ Pixel bestimmt wurde, zu sehen. Unten rechts sieht man das gemittelte Ergebnis mehrerer Regressionen. Durch die Mittelung soll das numerische Rauschen der regressierten Verteilungen in einem gewissen Maße unterdrückt werden. Der Wertebereich der einzelnen Regressionen wird hierbei von $n = 180 \rightarrow 500$ Pixel, $n = 181 \rightarrow 500$ Pixel, bis $n = 220 \rightarrow 500$ Pixel variiert.

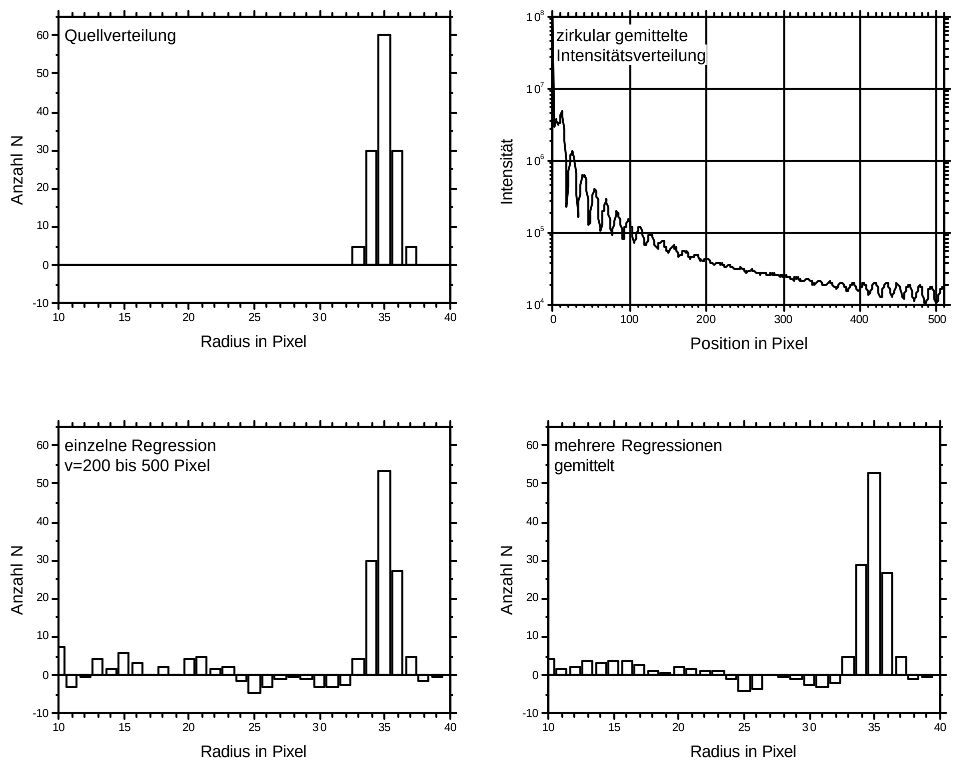


Abbildung 31: Verteilung 1.

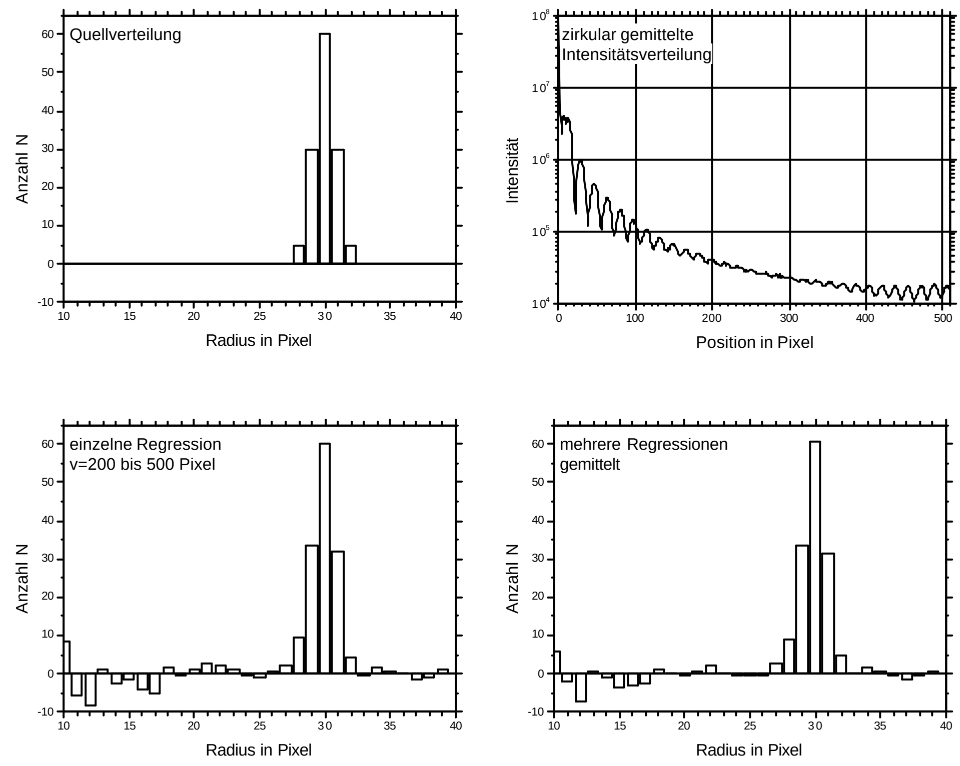


Abbildung 32: Verteilung 2.

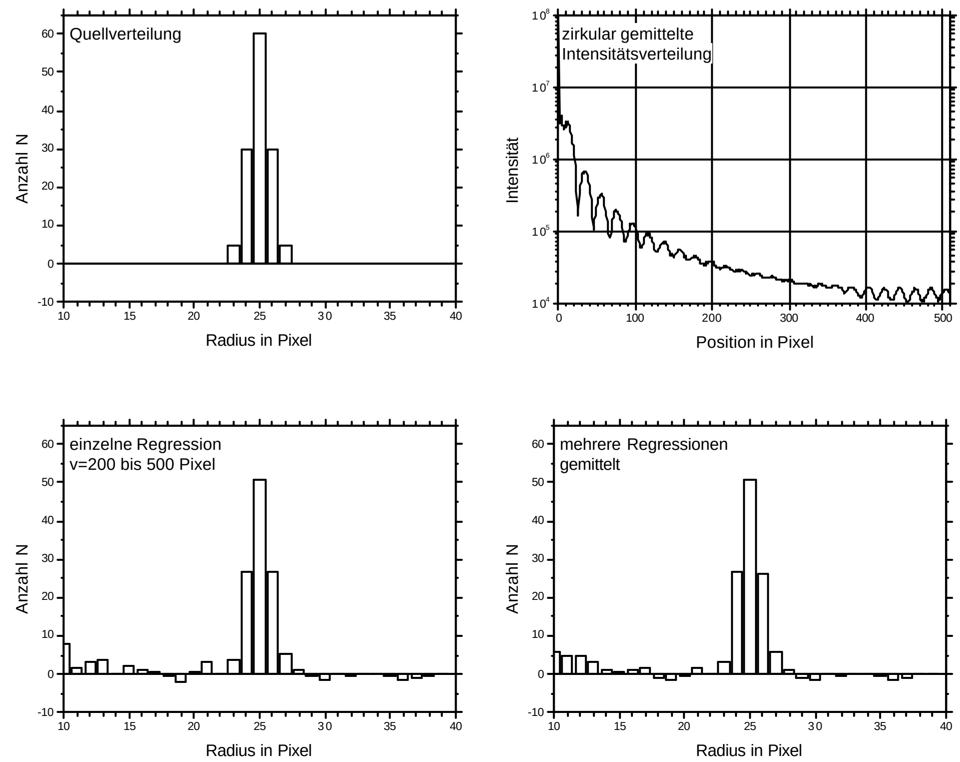


Abbildung 33: Verteilung 3.

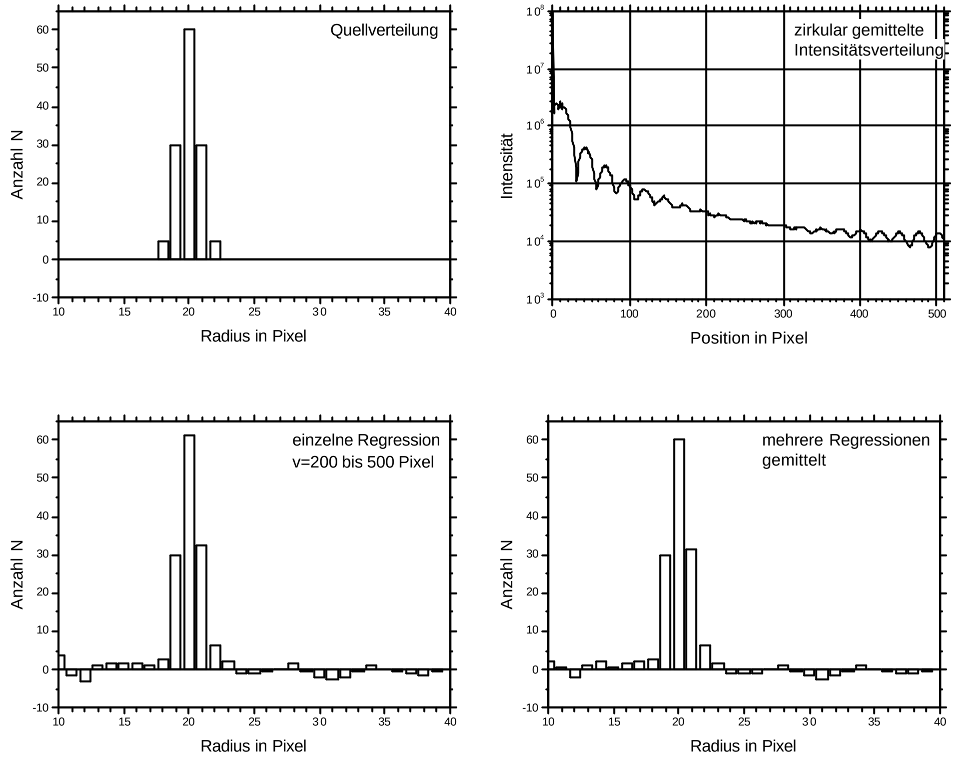


Abbildung 34: Verteilung 4.

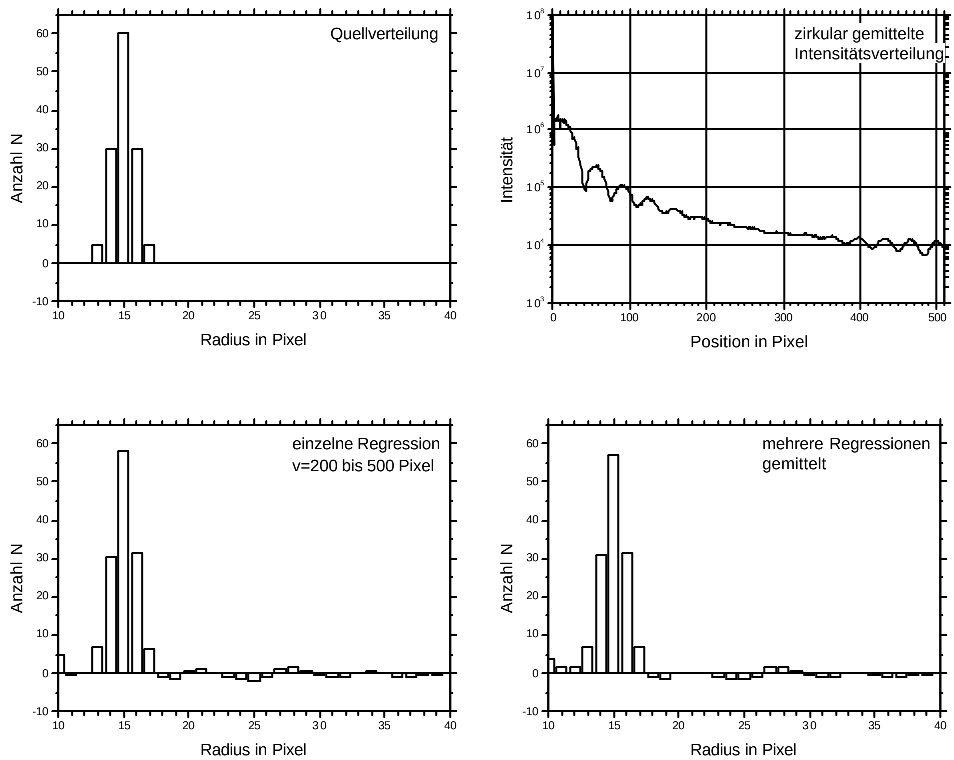


Abbildung 35: Verteilung 5.

Man erkennt, daß die Position der Quellverteilung keinen signifikanten Einfluß auf die Qualität der Regression hat. Lediglich eine leichte Verbesserung ist bei den Regressionen von kleinen Beugern zu beobachten.

	einzelne Regression		gemittelte Regression	
	mittl. Fehler	norm. Fehler	mittl. Fehler	norm. Fehler
Verteilung 1	2,45	2,36	2,18	2,10
Verteilung 2	2,17	2,14	1,73	1,60
Verteilung 3	1,82	1,67	1,88	1,75
Verteilung 4	1,39	1,33	1,32	1,12
Verteilung 5	1,12	1,00	1,14	1,06

Tabelle 1: Angabe des mittleren und des normierten mittleren Fehlers der verschiedenen Regressionen. Der Fehler ist in Anzahl der Beuger angegeben.

4.2.2 Variation der Breite der Größenverteilung

Als nächster Schritt wird der Einfluß der Breite der Quellverteilung auf die Qualität der Regression untersucht. In Abbildung 36 bis Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Regressionen bei verschieden breiten Quellverteilungen dargestellt. Es sind wie im vorherigen Abschnitt links oben die Quellverteilung, rechts oben die gemittelte Intensitätsverteilung des Beugungsbildes, links unten das Ergebnis einer einzelnen Regression und rechts unten das Ergebnis bei einer Mittelung über mehrere Regressionen dargestellt. Die einzelne Regression wird erneut über den Wertebereich $n = 200 \rightarrow 500$ Pixel bestimmt, die gemittelte Regression diesmal über den Wertebereich $n = 200 \cdots 240 \rightarrow 500$ bestimmt. In Tabelle 2 sind der mittlere und normierte mittlere Fehler der Regressionen aufgeführt. Zusätzlich sind noch die absolute Breite der Quellverteilung und die Anzahl der Beuger in der Quellverteilung angegeben.

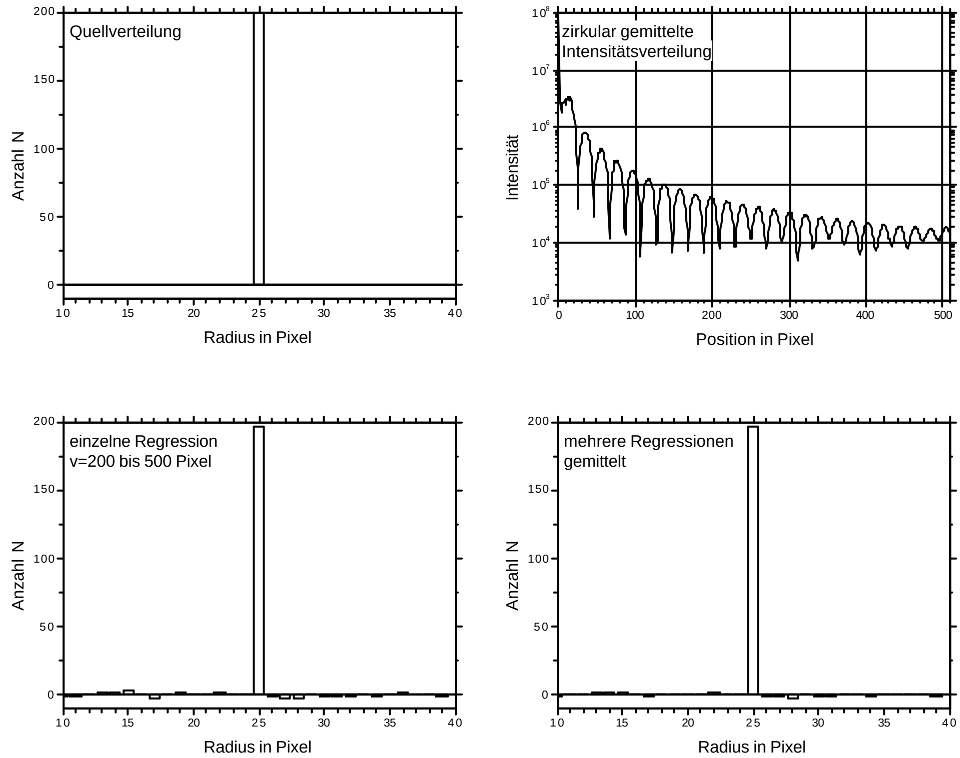


Abbildung 36: Verteilung 6.

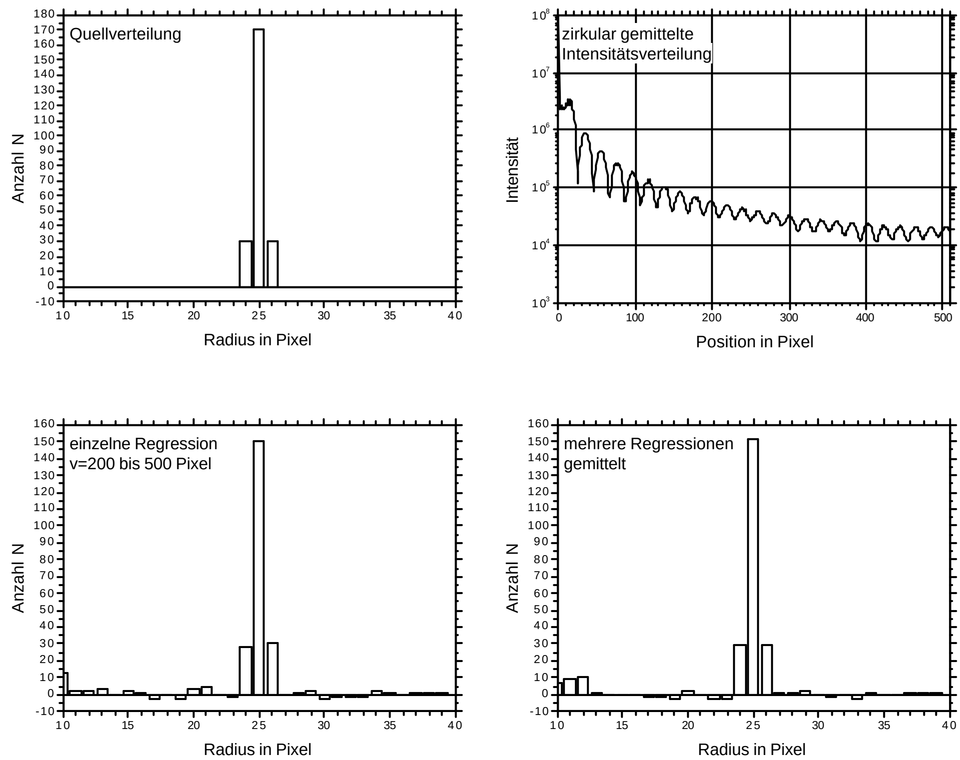


Abbildung 37: Verteilung 7.

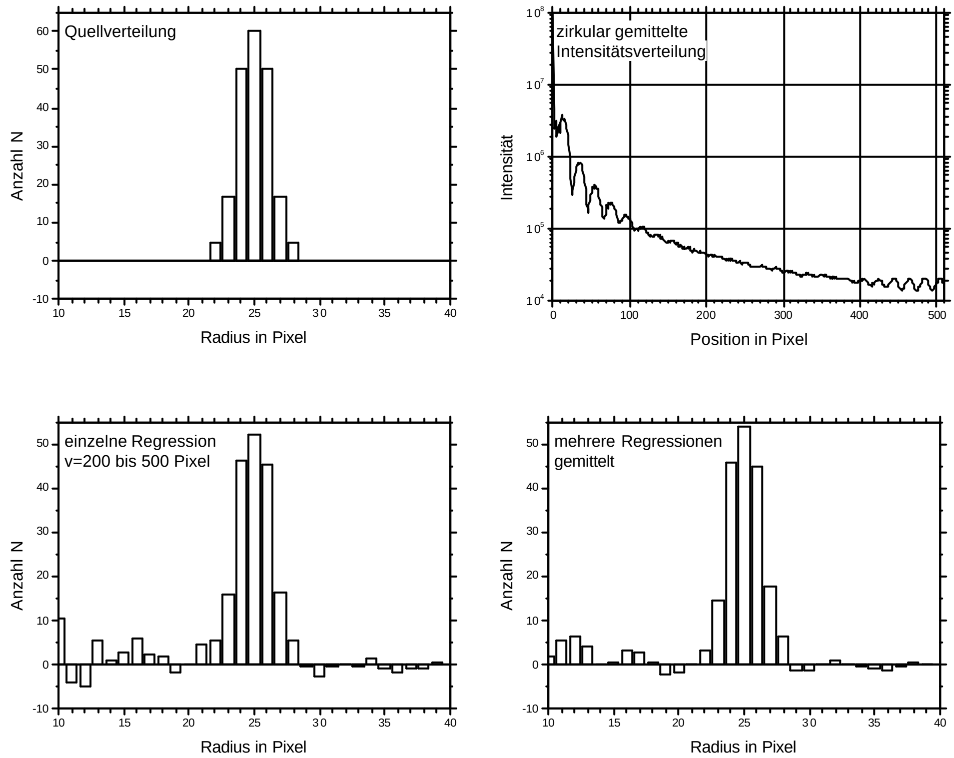


Abbildung 38: Verteilung 8.

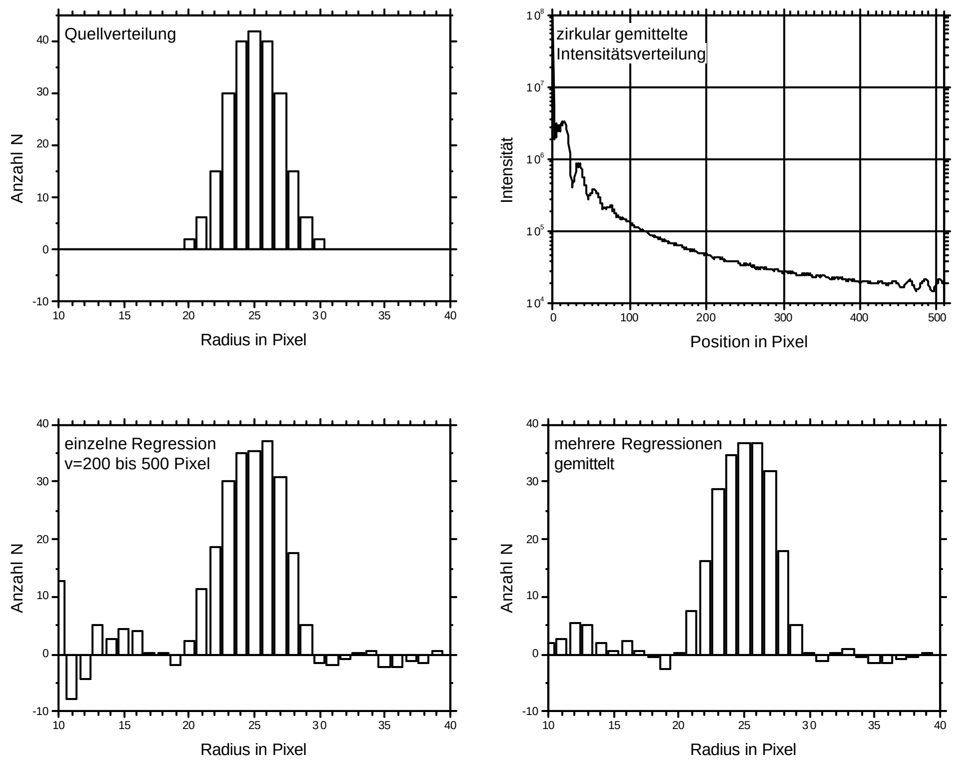


Abbildung 39: Verteilung 9.

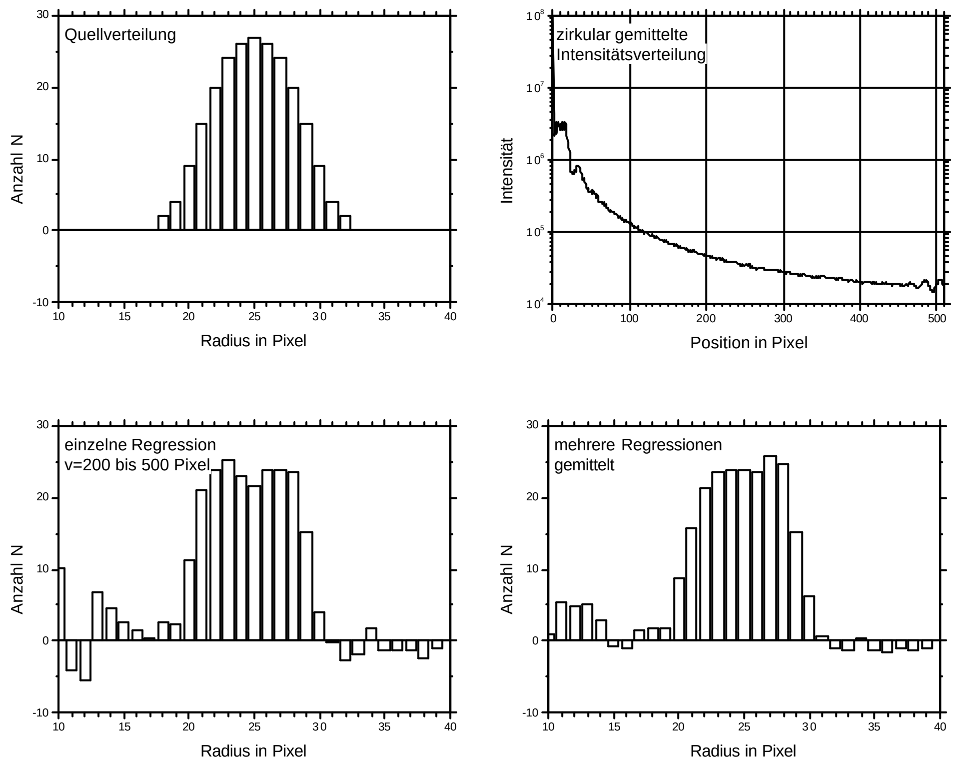


Abbildung 40: Verteilung 10.

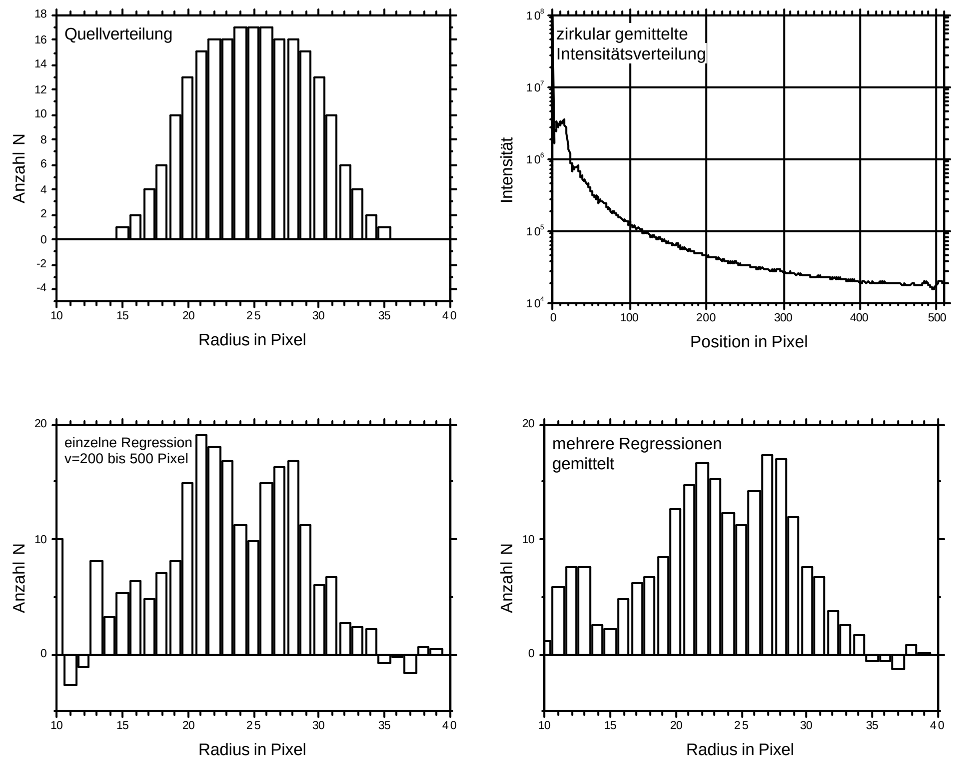


Abbildung 41: Verteilung 11.

			einz. Regression		gem. Regression	
	Breite	Anz.	mit. Fehler	nor. Fehler	mit. Fehler	nor. Fehler
Vert. 6	1	200	2,11	1,02	2,02	0,91
Vert. 7	3	230	3,01	2,39	2,96	2,40
Vert. 8	7	204	2,74	2,42	2,14	1,88
Vert. 9	11	228	2,88	2,78	1,95	1,85
Vert. 10	15	227	2,84	2,90	1,92	1,91
Vert. 11	21	217	2,69	2,79	2,30	2,28

Tabelle 2: Angaben zu den einzelnen Quellverteilungen und die dazugehörigen Fehlerberechnungen.

Die Ergebnisse der Verteilungen 6 bis 11 zeigen, daß die Mittelung über mehrere Regressionen meist zu besseren Ergebnissen führt als die einzelne Regression. Ebenso fällt auf, daß mit zunehmender Breite der Quellverteilung die Qualität der Regression abnimmt. Betrachtet man die berechneten Fehler der Regressionen, so ist diese Erkenntnis allerdings nicht sofort offensichtlich, da sich beispielsweise der mittlere Fehler der gemittelten Regression immer im Bereich von ungefähr zwei bis drei Beugern bewegt. Da aber mit zunehmender Breite der Quellverteilung auch ihre Höhe abnimmt (die Anzahl der Beuger im Quellbild ist begrenzt, da sonst nicht alle Beuger ohne Überlappung in das Quellbild passen), bleibt zwar der absolute Fehler in etwa konstant, der relative Fehler nimmt aber mit wachsender Breite der Quellverteilung zu.

Betrachtet man die zirkular gemittelten Intensitätsverläufe der einzelnen Quellverteilungen, so wird dieser Zusammenhang ebenfalls deutlich. Mit zunehmender Breite der Ausgangsverteilung verschmieren die charakteristischen Minima und Maxima immer stärker, und man erhält eine fast monoton abfallende Kurve (vgl. rechts oben in Abbildung 41).

4.2.3 Verschiedene Quellverteilungen

Nun werden einige ungewöhnliche Quellverteilungen dargestellt. Die Abbildungen zeigen wie auch in den beiden vorherigen Abschnitten die Quellverteilung, die zirkular gemittelte Intensitätsverteilung sowie die Ergebnisse einer einzelnen und der gemittelten Regression. Die einzelne Regression wird wieder über die Werte $n = 200 \rightarrow 500$ Pixel, die gemittelte Regression über $n = 200 \cdots 240 \rightarrow 500$ Pixel bestimmt.

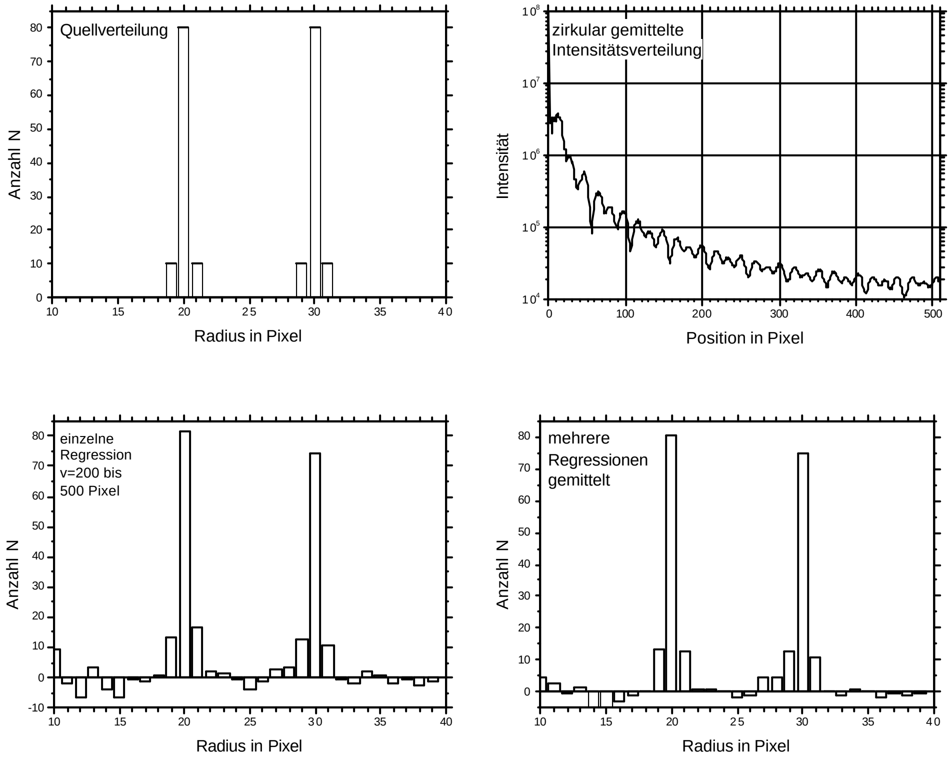


Abbildung 42: Verteilung 12.

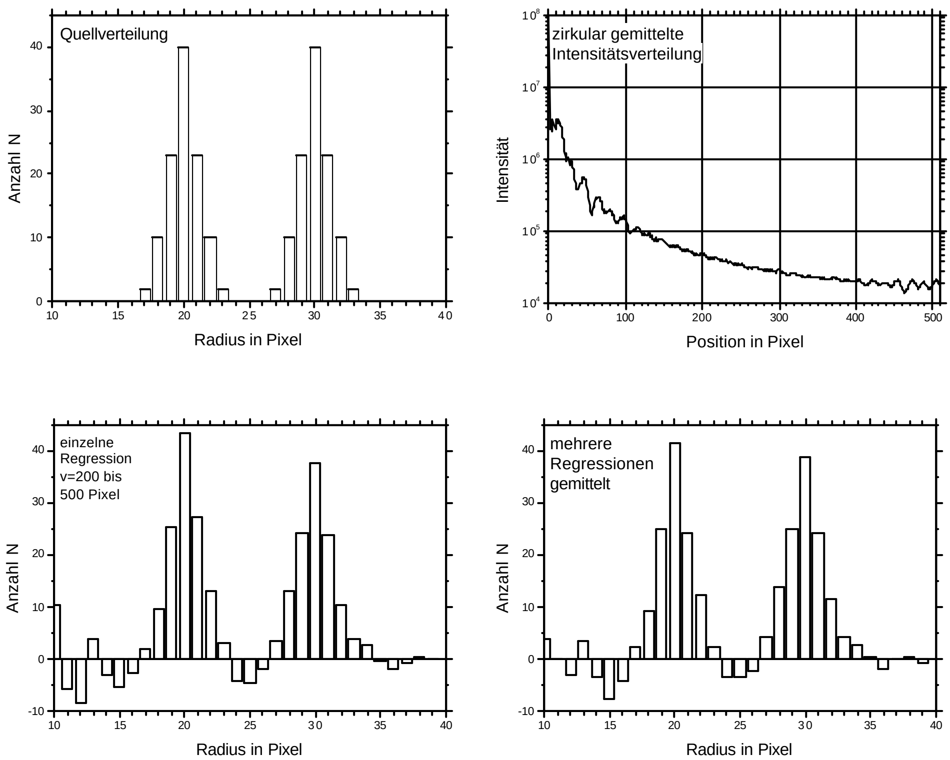


Abbildung 43: Verteilung 13.

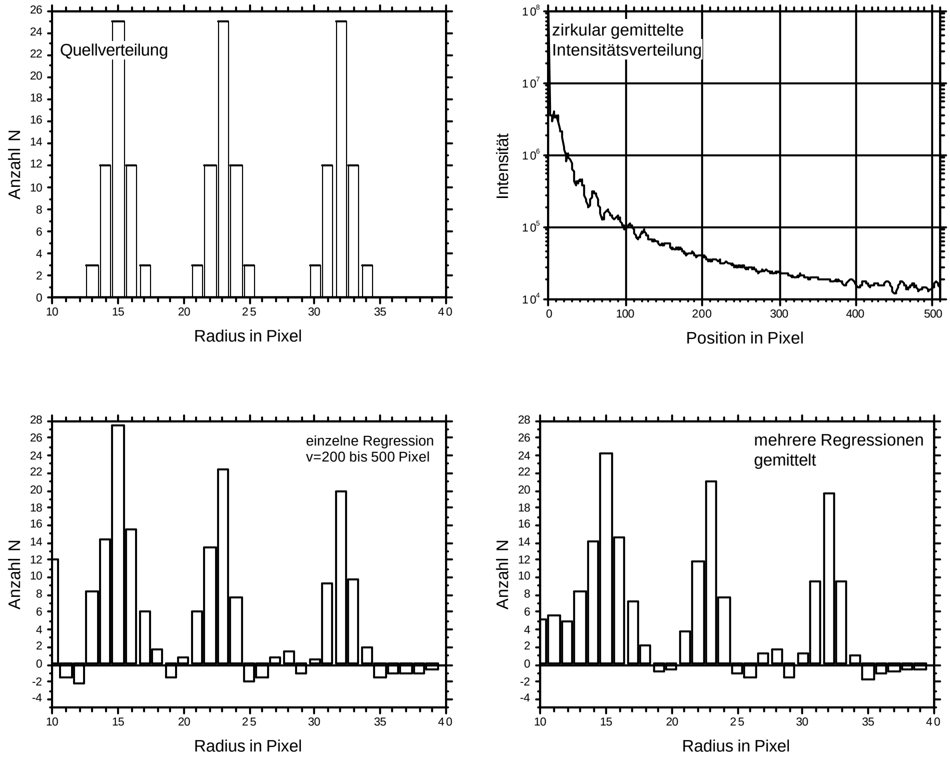


Abbildung 44: Verteilung 14.

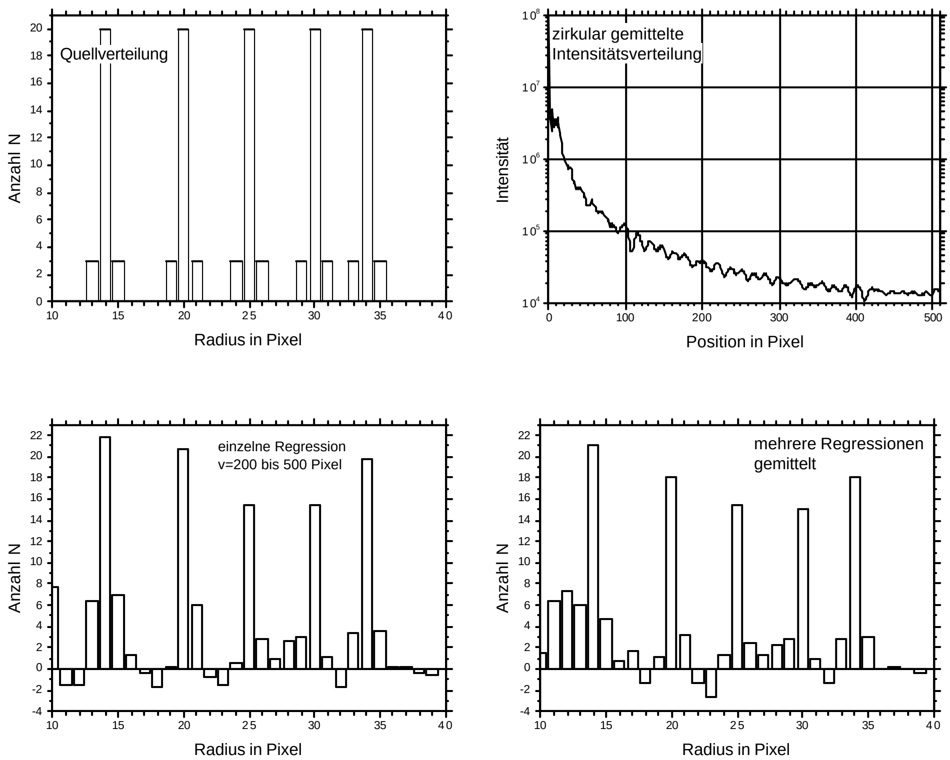


Abbildung 45: Verteilung 15.

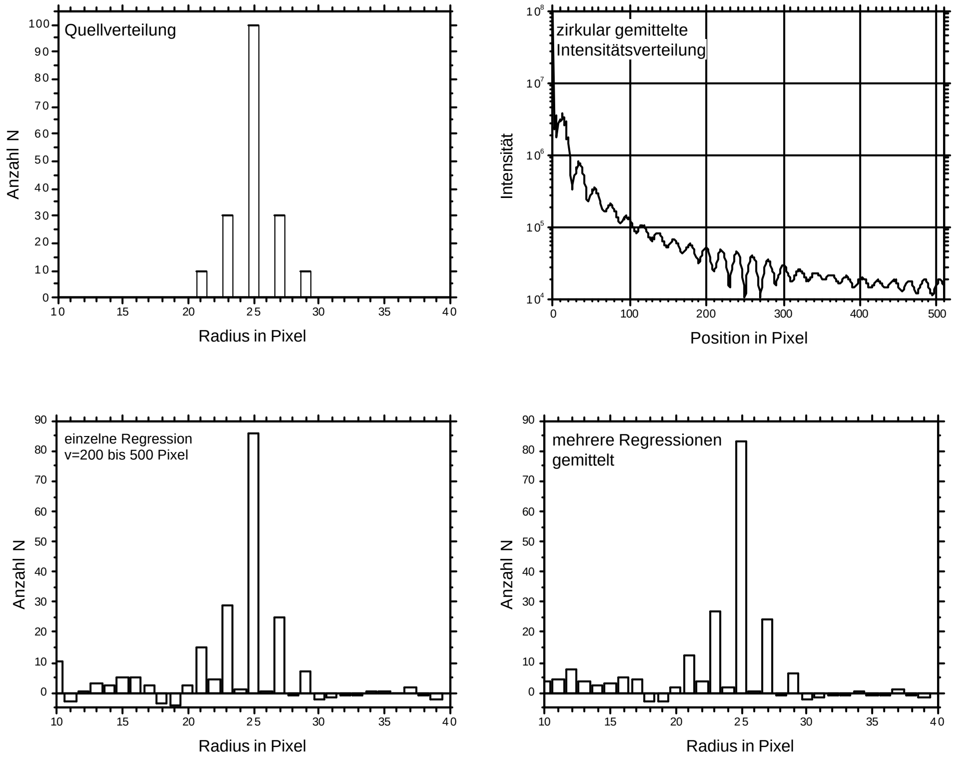


Abbildung 46: Verteilung 16.

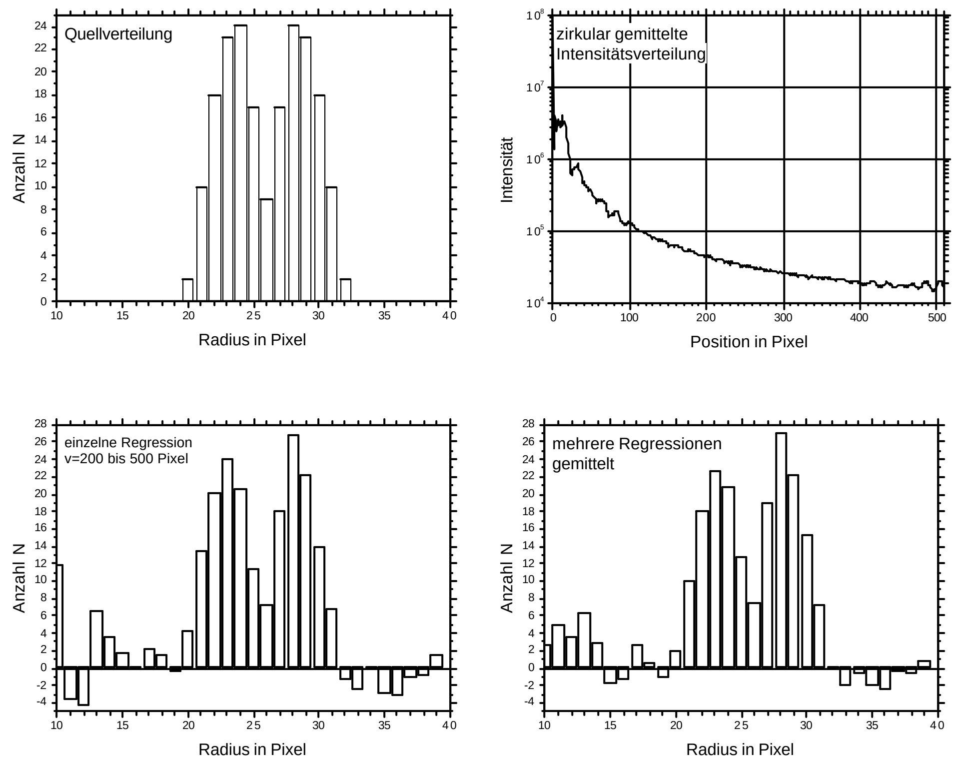


Abbildung 47: Verteilung 17.

	einzelne Regression		gemittelte Regression	
	mittl. Fehler	norm. Fehler	mittl. Fehler	norm. Fehler
Verteilung 12	2,74	2,57	2,20	1,91
Verteilung 13	2,37	2,64	1,99	2,06
Verteilung 14	2,46	2,47	2,32	2,33
Verteilung 15	1,70	1,73	1,77	1,76
Verteilung 16	3,03	2,84	2,98	2,88
Verteilung 17	2,56	2,67	1,97	1,91

Tabelle 3: Angabe des mittleren und des normierten Fehlers der verschiedenen Regressionen. Der Fehler ist in Anzahl der Beuger angegeben.

Die hier aufgezeigten Verteilungen, welche für menschliche Erythrozyten ungewöhnlich wären, zeigen exemplarisch, daß man mit einem zufriedenstellenden Ergebnis aus der Intensitätsverteilung des Beugungsbildes mittels Regression wieder die ursprüngliche Quellverteilung ermitteln kann. Die berechneten Fehler (vgl. Tabelle 3) liegen weitestgehend im Bereich von zwei bis drei Beugern.

4.3 Verbessertes Erythrozytenmodell

In den vorherigen Untersuchungen ist der Erythrozyt als undurchsichtige Kreisscheibe dargestellt. Es handelt sich somit nur um ein vereinfachtes Modell zur Untersuchung der Beugungseigenschaften an kreisrunden Scheiben.

Wie man in Abbildung 1 erkennt, zeichnet sich die Zelle allerdings durch eine spezielle Oberflächencharakteristik aus. Diese Eigenschaften der roten Blutkörperchen beeinflussen die Transmission des Lichtes. Die Zellen besitzen, wie in Kapitel 1 dargestellt, durch ihre unterschiedliche Dicke einen dunkleren Rand. Dies soll nun durch zwei Funktionen, eine für den Innenbereich und eine für den Rand, umgesetzt werden.

In Abbildung 48 ist der Verlauf der Helligkeit (schwarz=0, weiß=1) der beiden Funktionen $Color1(r)$ und $Color2(r)$ dargestellt. Die Funktion $Color1(r)$ für den inneren Bereich $0 \le r \le r_{MidPos}$ lautet:

$$Color1(r) = InColor - \left(\frac{r}{r_{MidPos}}\right)^{a_1} \cdot (InColor - MidColor) \quad [\,4.3\text{-}1\,]$$

Für den Außenbereich $r_{MidPos} \le r \le r_a$ gilt für $Color2(r)$:

$$Color2(r) = OutColor + \left(\frac{|r-p|}{r_a - p} \right)^{a_2} \cdot (MidColor - OutColor) \quad [\,4.3\text{-}2\,]$$

Über die Parameter a_1, a_2, r_{MidPos} und $p = (r_a - r_{MidPos})/2$ kann so die Form der Kurve verändert werden.

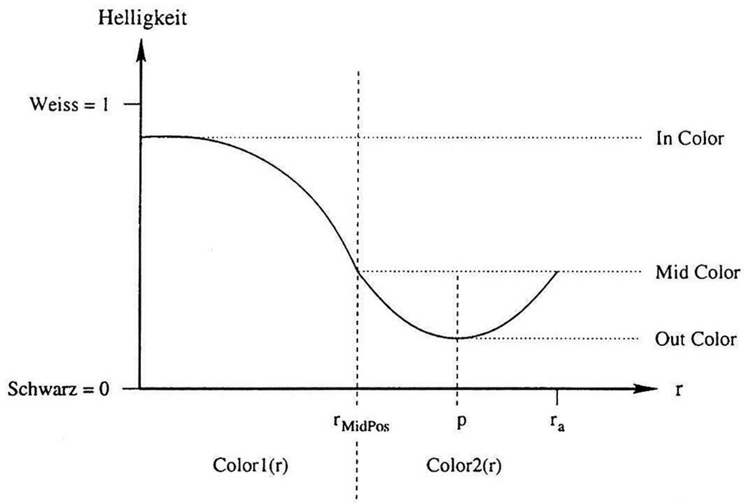


Abbildung 48: Schematischer Verlauf des Modells der Färbung des Erythrozyten (Quelle: Harting).

Es können nun also Quellbilder produziert werden, die der natürlichen Form und Beschaffenheit der Erythrozyten näherkommen. In Abbildung 49 ist ein Quellbild dargestellt, in dem alle Größen von Beugern ($r_a = 10 \cdots 40$ Pixel) vorkommen.

Im Folgenden soll bei dem verbesserten Erythrozytenmodell geprüft werden, ob die Regressionen der berechneten Beugungsbilder ebenso wie beim bisherigen Kreisscheibenmodell zuverlässige Angaben über die Quellverteilung liefern.

Vergleicht man die Beugungsbilder einer schwarzen Kreisscheibe und diesem Erythrozytenmodell, so erkennt man, daß sie sich sehr stark ähneln. In Abbildung 50 sind die zirkular gemittelten Intensitätsverläufe der beiden Beugungsbilder dargestellt. Vom Verlauf her sind beide Kurven fast gleich aber etwas verschoben. Es dürfte also kein Problem sein, auch diese Beugungsbilder mit denselben Basisfunktionen zu regressieren.

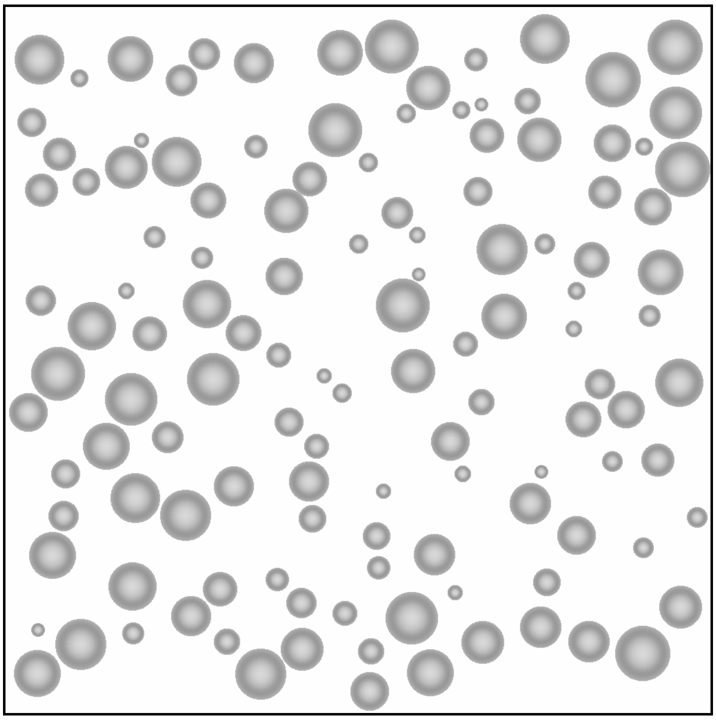


Abbildung 49: Quellbild mit allen möglichen Größen des verbesserten Erythrozytenmodells (Radien 10 bis 40 Pixel).

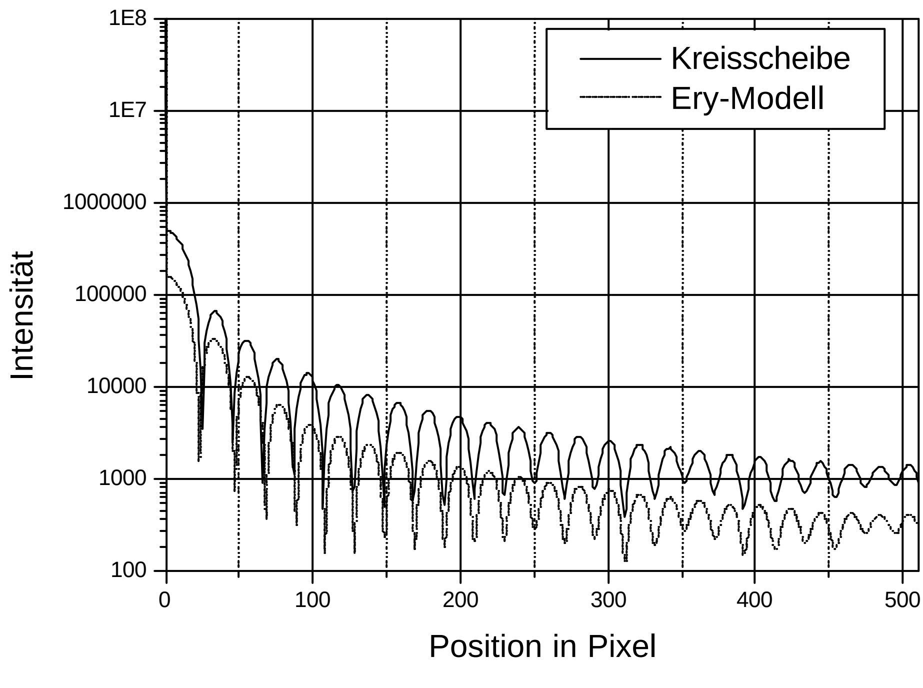


Abbildung 50: Zirkular gemittelter Intensitätsverlauf des Beugungsbildes einer Kreisscheibe mit einem Radius von 25 Pixel und des verbesserten Erythrozytenmodells gleicher Größe.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse einiger Quellverteilungen, die mit dem Erythrozytenmodell erstellt werden, dargestellt. Die Parameter werden dabei auf

$$a_1 = 2 \qquad a_2 = 1{,}5 \qquad \mathrm{r_{MidPos}} = 0{,}55 \cdot r_a$$
$$InColor = 0{,}85 \qquad \mathrm{MidColor} = 0{,}7 \qquad \mathrm{OutColor} = 0{,}6 \qquad [\ 4.3\text{-}3\ ]$$

festgelegt. Die einzelne Regression wird wieder über die Werte $n = 200 \rightarrow 500$ Pixel, die gemittelte Regression über die Werte $n = 200 \cdots 240 \rightarrow 400$ Pixel bestimmt. Zuerst werden in den folgenden Abbildungen die Position und schließlich die Breite der Quellverteilung variiert.

Der mittlere und der normierte mittlere Fehler sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Qualität der Regression nimmt auch hier mit zunehmender Breite der Verteilung ab. Es fällt weiterhin auf, daß der mittlere Fehler sehr viel größer ist als bei den vorherigen Regressionen. Dies liegt daran, daß der Intensitätsverlauf der Beugungsbilder des Erythrozytenmodells gegenüber der Kreisscheibe verschoben ist (Vgl. Abbildung 50).

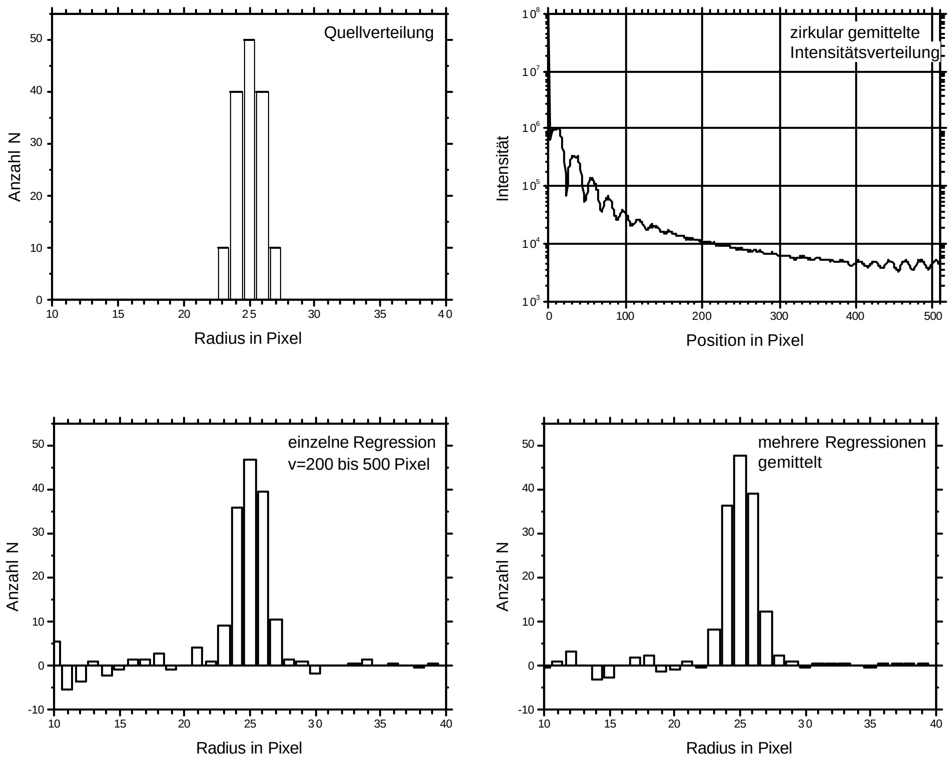


Abbildung 51: Verteilung 18.

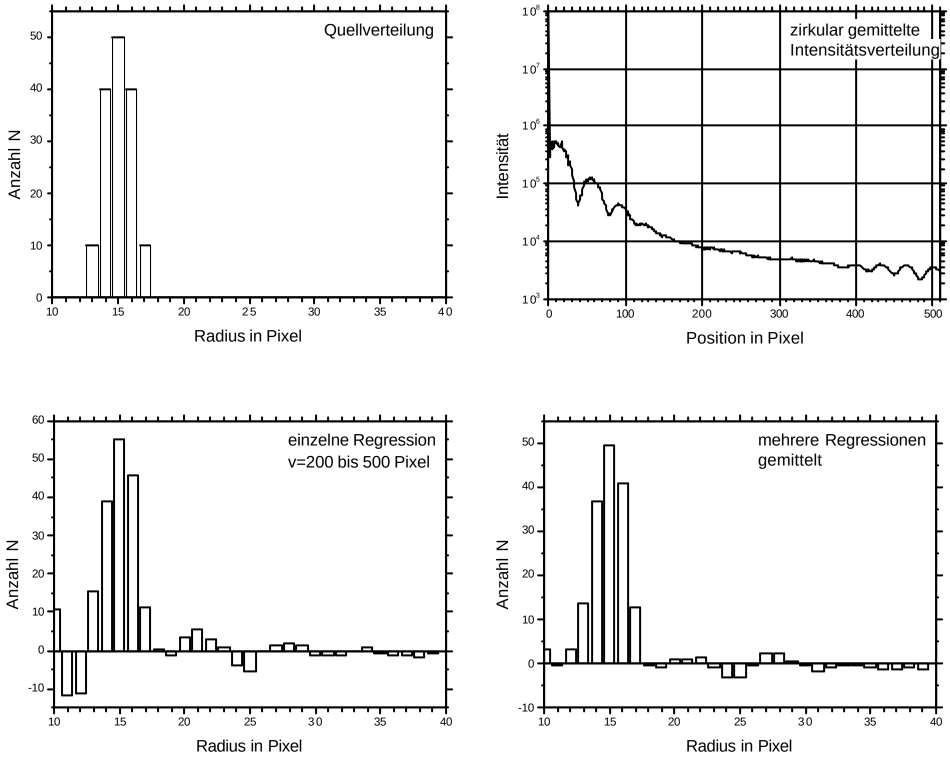


Abbildung 52: Verteilung 19.

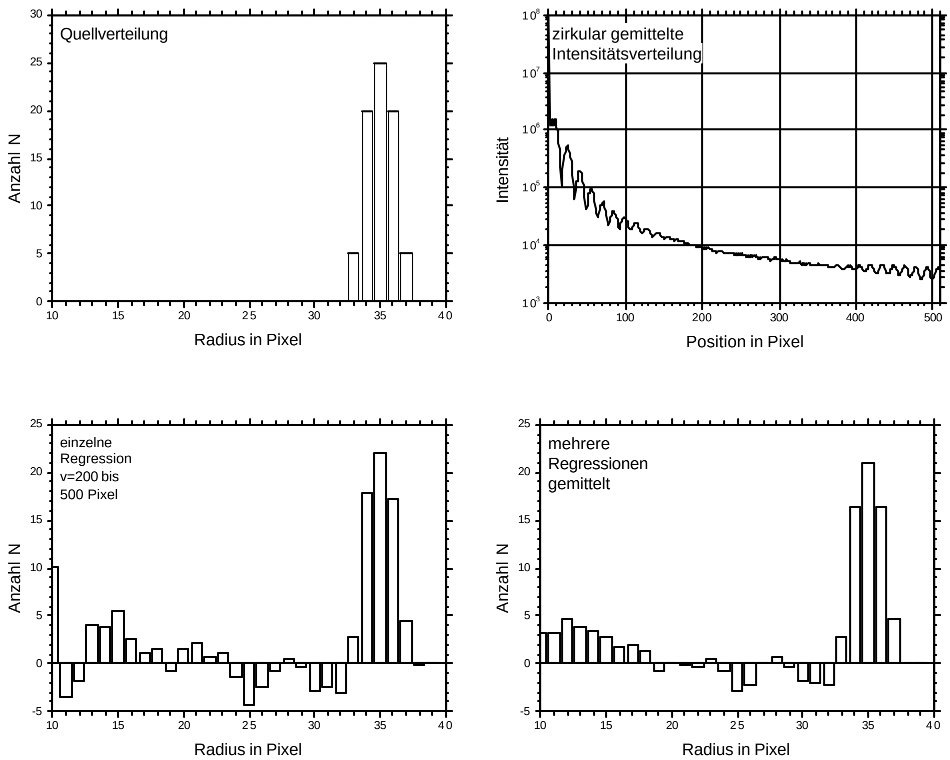


Abbildung 53: Verteilung 20.

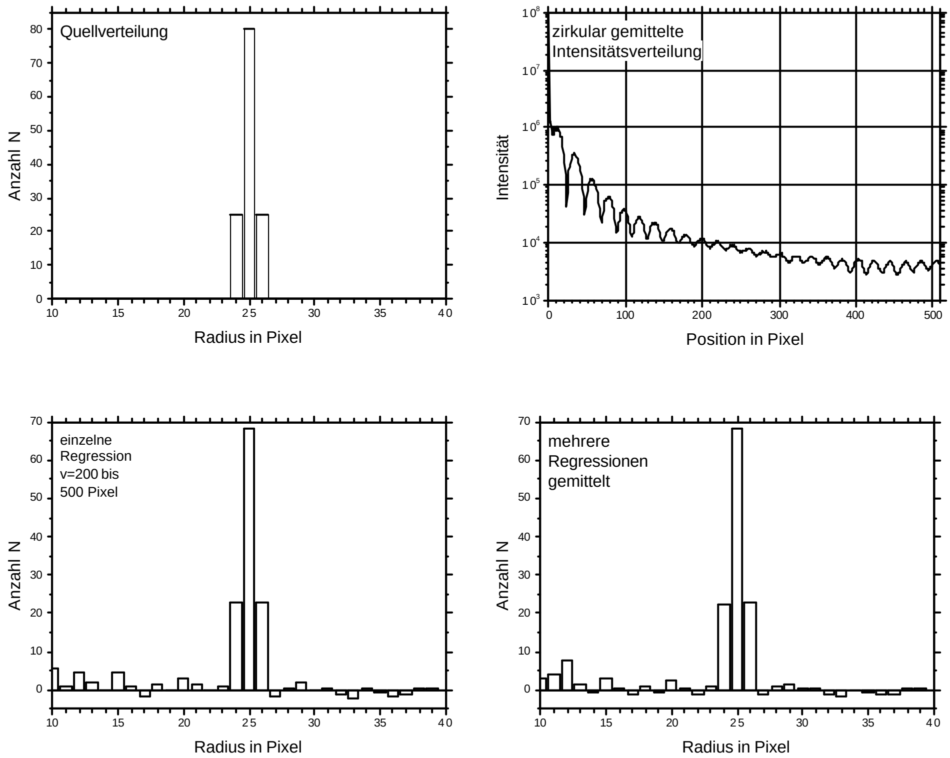


Abbildung 54: Verteilung 21.

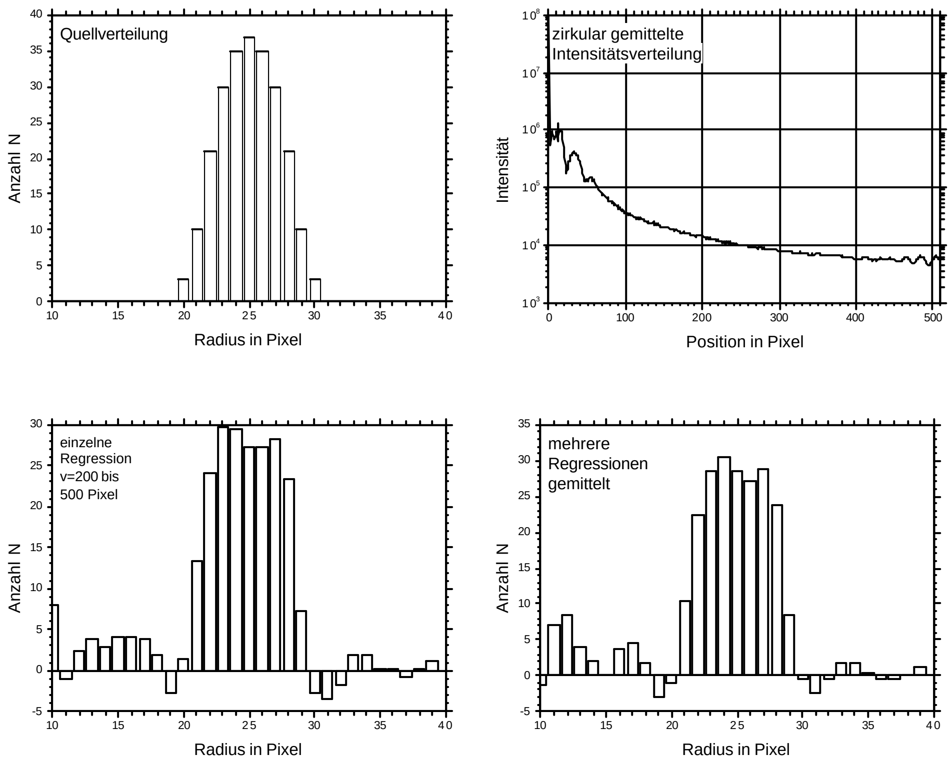


Abbildung 55: Verteilung 22.

	einzelne Regression		gemittelte Regression	
	mittl. Fehler	norm. Fehler	mittl. Fehler	norm. Fehler
Verteilung 18	4,59	1,55	4,56	1,16
Verteilung 19	4,62	2,96	4,53	1,45
Verteilung 20	2,40	2,25	2,36	1,77
Verteilung 21	4,00	1,81	3,99	1,73
Verteilung 22	7,16	2,89	7,16	2,64

Tabelle 4: Angabe des mittleren und des normierten mittleren Fehlers der verschiedenen Regressionen. Der Fehler ist in Anzahl der Beuger angegeben.

Die generierten Beugungsbilder weisen eine recht hohe Ähnlichkeit mit natürlichen Erythrozyten auf. Die Versuche des verbesserten Erythrozytenmodells zeigen, daß die zugrunde liegenden Quellverteilungen - trotz der höheren berechneten Fehler - aus den Beugungsbildern mittels Regression recht zuverlässig bestimmt werden können.

5 Diskussion und Ausblick

Die mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten sind sowohl für den Wissenschaftler als auch für den in der Klinik tätigen Mediziner von Bedeutung, da es bei einer Reihe von Krankheiten zu einer eingeschränkten Verformbarkeit der roten Blutkörperchen kommt (z.B. hereditäre Sphärozytose, Sichelzellanämie). Bei neueren Untersuchungen zur Erythrozytenflexibilität hat sich die Laserdiffraktoskopie als ein besonders geeignetes Verfahren bewährt. Das Diffraktoskop erlaubt es aber vielmehr auch, Beugungsphänomene an den roten Blutkörperchen in mehrfacher Hinsicht zu beobachten. Neben der Ermittlung der Erythrozytengeometrie, wenn die Zellen mechanischem Streß ausgesetzt werden, und der Bestimmung des mittleren Durchmessers stellt sich die Frage, ob mit einem solchen oder ähnlichen Versuchsaufbau auch Aussagen über die Durchmesserverteilung der Erythrozyten getroffen werden können.

Neben den meisten elektronischen Zählgeräten, die die Volumina und nicht die Durchmesser bestimmen, existieren zwar bereits Geräte (z.B. Hersteller Fritsch, Gerät Analysette 22), die die Beugung des Lichtes zur Partikelgrößenbestimmung nutzen, sie werden jedoch meist in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt und nutzen Medien, die die Zellbeschaffenheit teilweise verändern. Weitere Methoden zur Ermittlung der Größenverteilung sind beispielsweise auch die Holographie[33] und das sogenannte „dynamic light scattering“[34,35]. Diese fanden in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Anwendung. Als Referenzmethode gilt nach jetzigem Stand der Forschung nach wie vor die mikroskopische Partikelgrößenbestimmung, da sie von allen Methoden die genauesten Meßergebnisse liefert[36]. Wie bereits in der Einleitung besprochen ist diese Methode auch diejenige, die am meisten zeitintensiv ist.

Zahlreiche Autoren beschreiben die Partikelgrößenbestimmung mittels Laserbeugung daher als eine präzise und schnelle Methode[37,38,39], auf der auch die Untersuchungen dieser Arbeit beruhen. Denn ebenso wie in den angegebenen Quellen können unter Fraunhofer’schen Bedingungen

Partikelgrößen generell sehr genau bestimmt werden. Zudem ist diese Methode wesentlich weniger zeitintensiv als die mikroskopische Messung.

Erste Überlegungen führten zu der Annahme, daß eine Analyse des ersten Minimums im Beugungsbild genaue Ergebnisse über die Größenverteilung erbringen könnte. Dies jedoch erwies sich aufgrund begrenzt enthaltener Information als unzureichend (Vgl. Abbildung 56), weil ein größerer Bereich des Bildes ausgenutzt werden sollte.

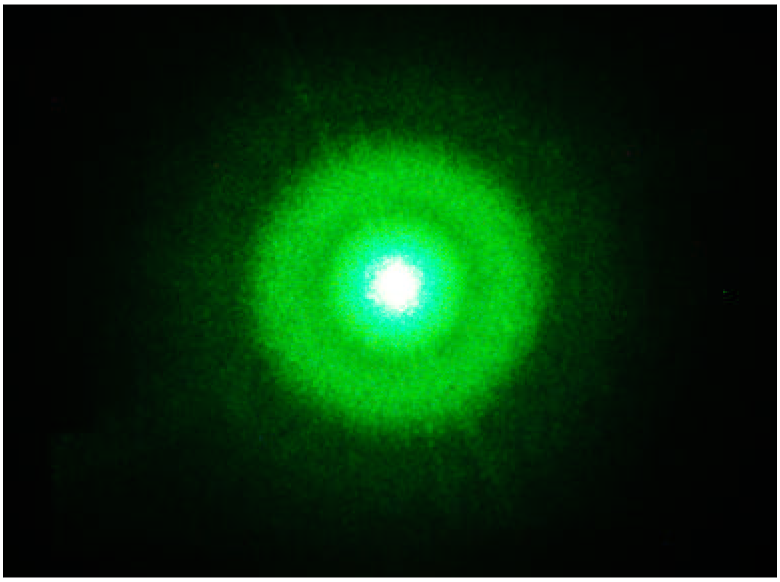


Abbildung 56: Beispiel eines entstehenden Beugungsbildes einer Blutprobe.

Daher nutzt das hier Anwendung findende Verfahren einen großen Teil des für die Quellverteilung charakteristischen Intensitätsverlaufes des Beugungsmusters, so daß durch die lineare Regression genauere Ergebnisse erzielt werden. Denn wie in Kapitel 4 gezeigt, wird meist über den Bereich von $n = 200 \rightarrow 500$ Pixel gerechnet und somit der Großteil des Beugungsbildes genutzt.

Entscheidend für die Weiterentwicklung des in dieser Arbeit beschriebenen Ansatzes zur Bestimmung der Durchmesserverteilung mittels Laserbeugung ist die Tatsache, daß die Bestimmung der ursprünglichen Quellverteilung aus dem Beugungsbild durch lineare Regression im Computermodell möglich ist. Das verwendete Computermodell ist in der Lage, die theoretischen Zusammenhänge aufzuzeigen und Beugungsbilder zu generieren, die anschließend Fourier-transformiert werden. Mittels linearer Regression kann also aus dem erzeugten Beugungsbild die ursprüngliche Quellverteilung bestimmt werden.

Diese Simulation der Beugungsbilder zeigt, daß die physikalischen Gesetze im Sinne des Verschiebungssatzes, des Ähnlichkeitssatzes und der Linearität der Fourier-Transformation nachvollzogen und verifiziert werden können (Vgl. Kapitel 2.7). Verschiedene Quellverteilungen unter Variation von Mittelwert, Breite und Form können mit zufriedenstellenden Ergebnissen aus den Beugungsbildern bestimmt werden.

Als größtes Problem des jetzigen Forschungsstandes erweist sich der unvermeidbare Verlust des Phasenterms (Vgl. Kapitel 2), der bei der Aufnahme des Beugungsbildes und anschließender Auswertung auftritt, womit sich bereits vor Durchführung dieser Arbeit zahlreiche Autoren beschäftigt haben[40,41,42]. Daher muß ein mathematischer Weg gefunden werden, um genügend Informationen aus dem Beugungsbild zu erhalten. Zur Optimierung des Modells wurde eine zirkulare Mittelung des Beugungsbildes durchgeführt (Vgl. Kapitel 3.3), wodurch das starke Rauschen nahezu vollständig unterdrückt werden kann. Bei der Bestimmung der Quellverteilung wird darüber hinaus eine Mittelung über mehrere Regressionen durchgeführt, wodurch die Qualität der Ergebnisse gesteigert wird. Die mathematischen Berechnungen könnten möglicherweise weiter verbessert werden, indem quadratische Koeffizienten im Regressionsansatz Verwendung fänden. Hierdurch könnten negative Koeffizienten in der mathematisch ermittelten zugrundeliegenden Quellverteilung verhindert werden, wodurch das numerische Rauschen etwas unterdrückt werden kann. Zur Realisierung dieses Lösungsansatzes sind jedoch nichtlineare Verfahren erforderlich, die sich von einem Startwert aus iterativ der Lösung immer mehr annähern.

Neben den gerade beschriebenen mathematischen Verbesserungen wurde auch das zunächst vereinfachte Erythrozytenmodell in Form von homogenen Kreisscheiben im Sinne der wahren Erythrozytenmorphologie optimiert. Dieses in Kapitel 4.3 beschriebene verbesserte Modell liefert gute Resultate unter bereits sehr realistischen Bedingungen. Diese

Ergebnisse zeigen, daß in einem Beugungsbild genügend Informationen enthalten sind, um die Größenverteilung der zugrundeliegenden Erythrozyten zu ermitteln.

Somit wird in dieser Arbeit über die bereits existierenden Möglichkeiten hinaus ein neuer Weg aufgezeigt, wie mit einem zunächst einfachen Versuchsaufbau (und später eventuell als Erweiterung des Diffraktoskops) Rückschlüsse aus einem Beugungsbild auf die zugrunde liegende Größenverteilung der Erythrozyten durch lineare Regression gezogen werden könnten. Da die Untersuchung der Erythrozytenflexibilität hier nicht von Interesse ist, kann man zur Bestimmung der Durchmesser und deren Verteilung auf die Zylinderrotation des Diffraktoskops verzichten. Erythrozyten im ungescherten Zustand erzeugen ein kreisförmiges Beugungsbild. Das Diffraktoskop dient in diesem Falle, in dem die roten Blutkörperchen keiner Schubspannung ausgesetzt werden, als eine Vorrichtung, die es ermöglicht, ein Beugungsbild von den nicht ausgerichteten, zufällig angeordneten Zellen zu erzeugen. Statistisch gesehen befinden sich die Erythrozyten durch die fehlende Orientierung in einer Kugelform. Es wird bei stillstehendem Rotationszylinder also lediglich ein Beugungsbild einer verdünnten Blutprobe, die sich in einem schmalen Spalt befindet, erzeugt. Daher erscheint es sinnvoll, einen neuen, vereinfachten Modellaufbau zu schaffen, um einige Aspekte genau betrachten zu können. Ein solcher einfacher Versuchsaufbau könnte etwa wie folgt aussehen.

Eine mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Blutprobe wird zunächst auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen versehen. Ein Laserstrahl (633 nm) wird auf den Objektträger mit der verdünnten Blutprobe gesandt, wobei das entstehende Beugungsbild auf einem Schirm aufgefangen wird. Eine Digitalkamera nimmt dieses Bild unter einem feststehenden Winkel auf. Die Weiterverarbeitung und Analyse dieses digitalen Bildes erfolgt dann am Computer.

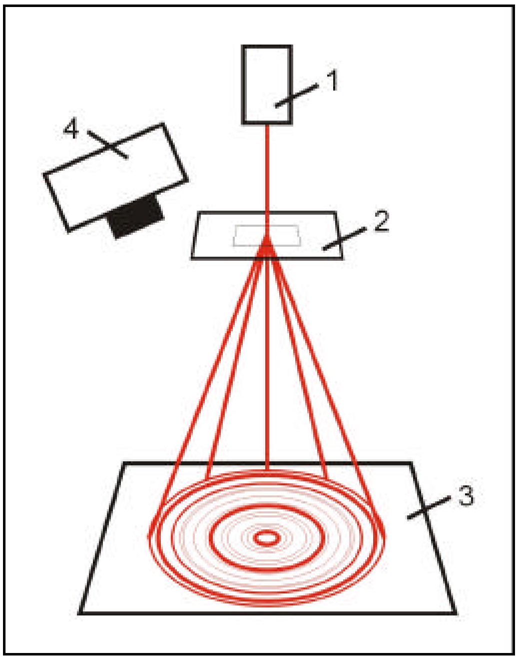


Abbildung 57: Schematischer neuer Modellaufbau. 1 = Laser, 2 = Objektträger mit verdünnter Blutprobe, 3 = Schirm mit entstehendem Beugungsbild, 4 = Digitalkamera.

In der praktischen Umsetzung besitzt der vereinfachte Versuchsaufbau mehrere Vorteile: Einerseits werden unter Verwendung des einfacheren, minimalistischen Aufbaus die optischen Phänomene des Diffraktoskops zunächst für ein besseres Verständnis der Vorgänge und, um Störfaktoren wie beispielsweise verschiedene optische Medien zu eliminieren, vereinfacht. Andererseits gehen grundsätzlich im Lichtweg sehr viele rote Blutkörperchen gleichzeitig in die Messung ein, so daß eine automatische Bestimmung sehr vieler Zellen auf einmal erfolgt, was eine erhebliche Erleichterung zur Price-Jones-Technik darstellt. Des weiteren hat die isotone Kochsalzlösung als Verdünnungsmedium keine signifikante Änderung der Zellbeschaffenheit zur Folge. Außerdem handelt es sich um einen preisgünstigen Aufbau zur Bestimmung der Durchmesserverteilung der Erythrozyten. Das Abdecken der Probe mit dem Deckgläschen führt zu einer horizontalen Ausrichtung der Zellen. So werden diese vom Laserstrahl in ihren maximalen Ausdehnungen getroffen. Es entsteht ein Beugungsbild, das nicht durch zahlreiche seitlich getroffene Zellen verfälscht wird, sondern hauptsächlich durch korrekt angeordnete Erythrozyten gebildet wird (Vgl. Abbildung 58).

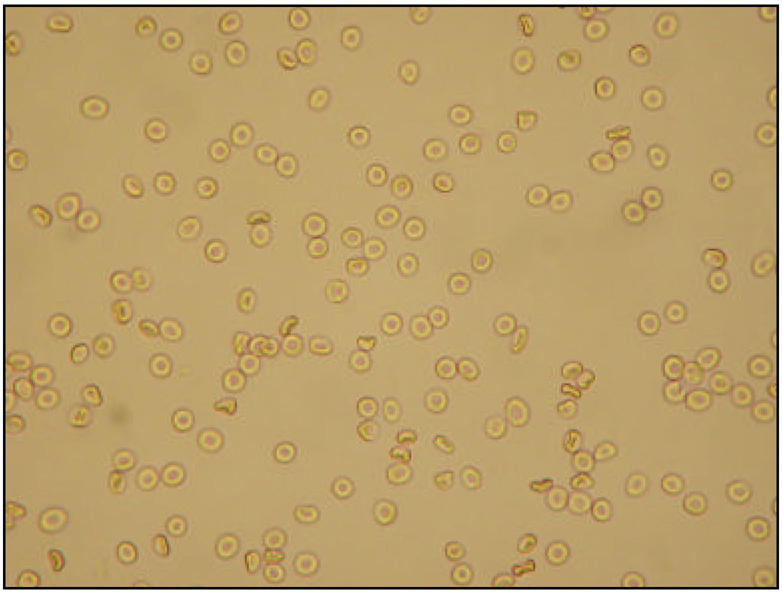


Abbildung 58: Mikroskopische Kontrolle der Anordnung der Erythrozyten unter dem Deckgläschen bei geeigneter Verdünnung. Die Zellen sind weitestgehend horizontal liegend orientiert.

Letztlich kann neben der im klinischen Alltag überwiegenden Bestimmung des mittleren Erythrozytenvolumens eine einfache Möglichkeit geschaffen werden, nun auch den mittleren Durchmesser und die Durchmesserverteilung von Erythrozyten zu bestimmen.

Trotz der oben genannten Vorteile befindet sich die Bestimmung der Größenverteilung mittels des hier vorgestellten Verfahrens noch am Anfang ihrer Entwicklung.

Somit müssen bei der praktischen Umsetzung des Lösungsansatzes mittels linearer Regression weitere Parameter bedacht, verändert und miteinbezogen werden, die zur Lösung der oben genannten Probleme führen können. Die Aufnahme der Beugungsbilder hat sich als problematisch erwiesen, da die Intensität in dem interessanten Randbereich wesentlich schwächer ist als in dem hellen Zentrum. Dies führt dazu, daß trotz theoretisch korrekter Belichtung des Randbereichs die starke Überbelichtung der Bildmitte eine Auswertung der Bereiche geringerer Intensität immens erschwert und somit eine Interpretation des Beugungsbildes nur bedingt möglich ist. Abbildung 56 zeigt eine angefertigte Aufnahme unter Verwendung des vereinfachten Versuchsaufbaus. Man erkennt deutlich, daß die Aufnahmequalität vor allem in den Randbereichen, die bei dem in dieser Arbeit genutzten Verfahren von besonderem Interesse sind, nicht der Auflösung entspricht, die man bei den berechneten Beugungsbildern im Computermodell erhält.

Die vollendete praktische Umsetzung des Lösungsansatzes, mittels linearer Regression unter Verwendung eines geeigneten Versuchsaufbaus die Erythrozytendurchmesserverteilung aus dem Beugungsbild zu bestimmen, muß Gegenstand sich an diese Arbeit anschließender Forschungen werden.

Im Modell wurde aber gezeigt, wie die im Beugungsbild enthaltene Information zur Bestimmung der zugrunde liegenden Verteilung der Erythrozytendurchmesser genutzt werden kann.

6 Zusammenfassung

Die Bestimmungen des mittleren Erythrozytendurchmessers und der Durchmesserverteilung sind zur Diagnostik diverser Erkrankungen von besonderem Interesse und häufig unerläßlich. Nach heutigem Stand der Wissenschaft gilt die mikroskopische Messung der Erythrozytendurchmesser immer noch als Goldstandard, wenn es um die Genauigkeit der Ergebnisse geht. In der klinischen Anwendung werden jedoch meist die Zellvolumina mittels des Impedanzmeßverfahrens bestimmt. Da die mikroskopische Messung sehr zeitaufwendig ist und immer noch kein zufriedenstellend schnelles Meßverfahren zur Bestimmung der Durchmesserverteilung existiert, wird in dieser Arbeit untersucht, ob mit Hilfe der Laserbeugung prinzipiell eine Bestimmung der Durchmesserverteilung der Erythrozyten möglich ist.

Um die Umsetzbarkeit dieses Ansatzes zu prüfen, wird zunächst ein Computermodell entwickelt, in dem verschiedene Quellverteilungen von Erythrozytenpopulationen generiert werden, aus denen mittels Fourier-Transformation das Beugungsbild berechnet wird. Ein Lösungsansatz, der mit Hilfe von linearer Regression die zugrunde liegende Quellverteilung aus dem Beugungsbild berechnet, kann so verifiziert werden.

Es wurde gezeigt, daß die im Beugungsbild enthaltene Information trotz Verlust des Phasenterms zur Bestimmung der zugrunde liegenden Durchmesserverteilung der Erythrozyten durch lineare Regression im Computermodell ausreicht. Mit Hilfe eines einfachen Versuchaufbaus könnte künftig neben dem mittleren Durchmesser auch die Verteilungskurve der Durchmesser der roten Blutkörperchen ermittelt werden. Vorraussetzung ist die Ausblendung des zentralen Beugungsbildes in etwa bis zum zweiten Maximum und die genaue Detektion des Randbereiches, dessen Intensität etwa $1/250$ der Intensität des Zentrums beträgt. Dies könnte mit Hilfe hochauflösender und zugleich hochsensitiver Digitalkameras erfolgen.

Die experimentelle Überprüfung des hier dargestellten Verfahrens muß Gegenstand weiterer Forschung sein.

7 Literaturverzeichnis

[1] Vgl. **SCHMIDT, R. F. / THEWS, G.**: *Physiologie des Menschen*, 27. Auflage, Berlin u.a.: Springer, 1997, S. 418.

[2] Vgl. **NIKINMAA, M.**: *Vertebrate red blood cells: adaptations of function to respiratory requirements*, Berlin u.a.: Springer, 1990.

[3] Vgl. **HEROLD, G.**: *Innere Medizin*, Köln: 2004, S. 20f.

[4] Vgl. **BEGEMANN, M.**: *Praktische Hämatologie: Diagnose, Therapie, Methodik*, 11. vollst. überarb. Auflage, Stuttgart / New York: Thieme, 1999, S. 22 und S.25.

[5] Vgl. **PRICE-JONES, C.**: *The variation in the size of red blood cells*, Br. Med. J. II, 1910, S. 1418.

[6] Vgl. **RICK, W.**: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 6. überarb. u. erw. Auflage, Berlin u.a.: Springer, 1990.

[7] Vgl. **BECKMAN COULTER GMBH**: *Praktischer Leitfaden für die Interpretation hämatologischer Fallbeispiele*, Krefeld, 2000, Kapitel 1.1.

[8] Vgl. **DÖRNER, K.**: *Klinische Chemie und Hämatologie*, 4. Auflage, Stuttgart: Thieme, 2001, S. 56.

[9] Vgl. **THEML, H.**: *Taschenatlas der Hämatologie: morphologische und klinische Diagnostik für die Praxis*, 4. überarb. Auflage, Stuttgart / New York: Thieme, 1998.

[10] Vgl. **YOUNG, T. H.**: *An introduction to medical literature including a system of practical nosology*, Underwood, London, 1813, S. 545.

[11] Zitiert nach **MÜLLER, F. / SEIFERT, O.**: *Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik*, 68. neubearb. Auflage, München: Verlag v. J. F. Bergmann, 1962, S. 461.

[12] Vgl. **BESSIS, M. / MOHANDAS, N.**: *A diffractometric method for the measurment of cellular deformability*, Blood Cells 1, 1975, S. 307-313.

[13] Vgl. **BESSIS, M. / MOHANDAS, N. / FEO, C.**: *Automated ektacytometry: A new method of measuring red cell deformability and red cell indices*, Blood Cells 6, 1980, S. 315-327.

[14] Vgl. **GRONER, W. / MOHANDAS, N. / BESSIS, M.**: *New optical technique for measuring erythrocyte deformability with the ektacytometer*, Clin. Chem. 26, 1980, S. 1435-1442.

[15] Vgl. **MORRIS, D. R. / WILLIAMS, A. R.**: *The effects of suspending medium viscosity on erythrocyte deformation and hemolysis in vitro*, Biochim. Biophys. Acta 550, 1979, S. 288-296.

[16] Vgl. **HARDEMANN, M. R. / GOEDHART, P. / BREEDERVELD, D.**: *Laser diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear stress using a rotational viscosimeter*, Clinica Chimica Acta 165, 1987, S. 227-234.

[17] Vgl. **BAYER, R. / SCHAUF, B. / GÜNTHER, B.**: *Erythrocyte shape analysis by means of laser diffraction*, SPIE 1641, 1992, S. 246-255.

[18] Vgl. **WOLF, G. / BAYER, R. / OSTUNI, D.**: *Stress-induced rigidification of erythrocytes as determined by laser diffraction and image analysis*, Optical Engineering 31(7), 1992, S. 1475-1481.

[19] Vgl. **BAYER, R. / WOLF, G.**: *Analysis of erythrocyte flexibility by means of laser diffraction: rigidification due to defined shearing*, SPIE 1981, 1993, S. 26-37.

[20] Vgl. **BAYER, R. / ÇAGLAYAN, S. / HOFMANN, R. / OSTUNI, D.**: *Laser diffraction of RBC: the method and its pitfalls*, SPIE 2100, 1994, S. 248-255.

[21] Vgl. **BAYER, R. / GREWELING, M. / WIMMER, T. / PRIEZZHEV, A. V.**: *Orientation and elongation of RBC in searle-flow in relation to forward scattering*, SPIE 3252, 1998, S. 62-69.

[22] Vgl. **KNEUBÜHL, F. K.**: *Repetitorium der Physik*, 2. überarb. u. erw. Auflage, Stuttgart: Teubner, 1982, Kapitel 6.

[23] Vgl. **POHL, R. W.**: *Optik und Atomphysik*, 11. verb. u. erg. Auflage, Berlin u.a.: Springer, 1963.

[24] Vgl. **HECHT, E.**: *Optik*, 3. korrigierter Nachdruck 1994, Bonn u.a.: Addison-Wesley, 1989, Kapitel 10.

[25] Vgl. **BERGMANN, L. / SCHAEFER, C.**: *Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3. Optik*, 9. Auflage, Berlin / New York: de Gruyter, 1993, S. 356ff.

[26] Vgl. **HECHT, E.**: *Optik*, a.a.O., Kapitel 11.

[27] Vgl. **GOODMAN, J. W.**: *Introduction to Fourier Optics*, 2. Auflage, New York u.a.: McGraw-Hill, 1996.

[28] Vgl. **LAUTERBORN, W. / KURZ, T. / WIESENFELDT, M.**: *Kohärente Optik: Grundlagen für Physiker und Ingenieure*, Berlin u.a.: Springer, 1993, S. 160f.

[29] Vgl. **PRESS, W. H. / TEUKOLSKY, S. A. / VETTERLING, W. T. / FLANNERY, B. P.**: *Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing*, 2. Auflage, Cambridge u.a.: Cambridge University Press, 1994.

[30] Vgl. **HARTING, D.**: *Theoretische Grundlagen zur numerischen Bestimmung der Größenverteilung bekannter Beuger in der Fourier-Optik*, Auswertung zum Laborversuch im Rahmen des F-Praktikums, Düsseldorf, 2003.

[31] Vgl. **PRESS, W. H. / TEUKOLSKY, S. A. / VETTERLING, W. T. / FLANNERY, B. P.**: *Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing*, a.a.O., Kapitel 15.1.

[32] Vgl. **HARTING, D.**: *Theoretische Grundlagen zur numerischen Bestimmung der Größenverteilung bekannter Beuger in der Fourier-Optik*, a.a.O.

[33] Vgl. **COËTMELLEC, S. / LEBRUN, D. / ÖZKUL, C.**: *Application of the two-dimensional fractional-order Fourier transformation to particle field digital holography*, J. Opt. Soc. Am. A. 19(8), 2002, S. 1537-1546.

[34] Vgl. **VEGA, J. R. / GUGLIOTTA, L. M. / GONZALEZ, V. D. / MEIRA, G. R.**: *Latex particle size distribution by dynamic light scattering: novel data processing for multiangle measurements*, J. Colloid Interface Sci. 261(1), 2003, S. 74-81.

[35] Vgl. **FERNANDES, M. X. / SANTOS, N. C. / CASTANHO, M. A.**: *Continuous particle size distribution analysis with dynamic light scattering*, J. Biochem. Biophys. Methods 36, 1998, S. 101-117.

[36] Vgl. **BREWER, E. / RAMSLAND, A.**: *Particle Size Determination by Automated Microscopical Imaging Analysis with Comparison to Laser Diffraction, J. Pharm. Sci. 84(4), 1995, S. 499-501.*

[37] Vgl. **OLAISEN, V. / NESSE, N. / VOLDEN, H.**: *Technical note: Use of laser diffraction for particle size distribution measurements in duodenal digesta*, J. Anim. Sci. 79(3), 2001, S. 761-765.

[38] Vgl. **ALLEN, T.**: *Particle Size Measurements, 5. Auflage, London u.a.: Chapman and Hall, 1997.*

[39] Vgl. **WEINER, B. B.**: *Particle and droplet sizing using Fraunhofer diffraction,* Aus: BARTH, H. G. (Hrsg.): *Modern Methods of Particle Size Analysis*, New York u.a.: John Wiley & Sons, 1984, S. 135.

[40] Vgl. **OPPENHEIM, A. V. / LIM, J. S.**: *The Importance of Phase in Signals*, Proc. IEEE 69(5), 1981, S. 529-541.

[41] Vgl. **KERMISCH, D.**: *Image reconstruction from phase information only*, J. Opt. Soc. Amer. 60(1), 1970, S. 15-17.

[42] Vgl. **LLOYD, P. J.**: *Particle size analysis 1988*, Particle Size Analysis Conference, Chichester u.a.: John Wiley & Sons, 1987.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Bayer gilt besonderer Dank für das interessante Thema, die sehr intensive Betreuung und die Ermöglichung, eine Dissertation unter überdurchschnittlich guten Rahmenbedingungen verfassen zu können.

Herrn Dr. G. Laschinski danke ich für die Vermittlung physikalischer Grundlagen der Laserbeugung und dafür, daß er durch seine aufgeschlossene Art zu einem sehr freundlichen Arbeitsklima am Institut für Lasermedizin beigetragen hat.

Besonders zu erwähnen ist Herr Dipl. Phys. D. Harting, der durch sein Praktikum am Institut für Lasermedizin und den darüber angefertigten Bericht einige entscheidende Denkanstöße zur Entwicklung eines Lösungsansatzes beigetragen hat. Zudem hat er das Computermodell programmiert. Hierfür gilt ihm mein ganz besonderer Dank.

Meinem Kommilitonen und Mitdoktoranden Herrn T. Lange danke ich für seine treue Begleitung während des Studiums und seine Freundschaft.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Lasermedizin für ihre Hilfsbereitschaft und das harmonische Arbeitsklima.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht haben, und meinen Geschwistern für ihre Ermutigungen, diese Arbeit anzufertigen und mich in jeder Hinsicht zu unterstützen.

Meiner zukünftigen Frau Claudia Walge danke ich ganz besonders für ihr Verständnis und ihre stete Hilfsbereitschaft während der Zeit dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Lukas Schlösser
Anschrift:	Am Hasenberg 30, 41462 Neuss
Geburtstag:	03.06.1977
Geburtsort:	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch
Eltern:	Dr.-Ing. Franz-Josef Schlösser, Geschäftsführer a.D. im Verein Deutscher Ingenieure; Josefine Schlösser, Hausfrau
Geschwister:	Dipl.-Ing. Georg Schlösser, Dipl.-Ök. Barbara Schlösser

Schulbildung

Aug. 1983 - Juli 1987	Gemeinschaftsgrundschule Stakerseite, Kaarst
Sept. 1987 - Juni 1996	Albert-Einstein-Gymnasium, Kaarst

Zivildienst

Sept. 1996 - Sept. 1997	Chirurgische und Gefäßchirurgische Abteilung, Johanna-Etienne-Krankenhaus, Neuss

Hochschulausbildung

Okt. 1997 - Nov. 2004	Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Okt. 2003 - Sept. 2004	Praktisches Jahr: Städtische Kliniken Neuss - Lukaskrankenhaus, Wahlfach: Anästhesie
17. Nov. 2004	Approbation als Arzt

Promotionsstudium

Aug. 2000 - Dez. 2004 (Studien begleitend)	Grundlagenarbeit zum Thema: „Untersuchungen zur Bestimmung der Durchmesserverteilung von Erythrozyten mittels Laserbeugung“, Institut für Lasermedizin, Prof. Dr. med. Rainer Bayer, Universitätsklinikum Düsseldorf
Apr. 2003 - Okt. 2003	Experimentelle Untersuchungen zu o.g. Promotionsarbeit

Studien begleitende Tätigkeiten

Okt. 1997 - Aug. 2000	Chirurgische und Gefäßchirurgische Abteilung, Johanna-Etienne-Krankenhaus, Neuss
Aug. 2000 - März 2004	Operative und Internistische Intensivstationen, Johanna-Etienne-Krankenhaus, Neuss
Aug. 2000 - Juni 2004 (überwiegende Zeit)	Studentische Hilfskraft, Universitätsklinikum Düsseldorf, Institut für Lasermedizin, Prof. Dr. med. Rainer Bayer

Ärztliche Tätigkeiten

seit Jan. 2005	Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin, Städtische Kliniken Neuss - Lukaskrankenhaus GmbH

Zusammenfassung (Abstract)

Die Bestimmungen des mittleren Erythrozytendurchmessers und der Durchmesserverteilung sind zur Diagnostik diverser Erkrankungen von besonderem Interesse und häufig unerläßlich. Nach heutigem Stand der Wissenschaft gilt die mikroskopische Messung der Erythrozytendurchmesser immer noch als Goldstandard, wenn es um die Genauigkeit der Ergebnisse geht. In der klinischen Anwendung werden jedoch meist die Zellvolumina mittels des Impedanzmeßverfahrens bestimmt. Da die mikroskopische Messung sehr zeitaufwendig ist und immer noch kein zufriedenstellend schnelles Meßverfahren zur Bestimmung der Durchmesserverteilung existiert, wird in dieser Arbeit untersucht, ob mit Hilfe der Laserbeugung prinzipiell eine Bestimmung der Durchmesserverteilung der Erythrozyten möglich ist.

Um die Umsetzbarkeit dieses Ansatzes zu prüfen, wird zunächst ein Computermodell entwickelt, in dem verschiedene Quellverteilungen von Erythrozytenpopulationen generiert werden, aus denen mittels Fourier-Transformation das Beugungsbild berechnet wird. Ein Lösungsansatz, der mit Hilfe von linearer Regression die zugrunde liegende Quellverteilung aus dem Beugungsbild berechnet, kann so verifiziert werden.

Es wurde gezeigt, daß die im Beugungsbild enthaltene Information trotz Verlust des Phasenterms zur Bestimmung der zugrunde liegenden Durchmesserverteilung der Erythrozyten durch lineare Regression im Computermodell ausreicht. Mit Hilfe eines einfachen Versuchaufbaus könnte künftig neben dem mittleren Durchmesser auch die Verteilungskurve der Durchmesser der roten Blutkörperchen ermittelt werden. Vorraussetzung ist die Ausblendung des zentralen Beugungsbildes in etwa bis zum zweiten Maximum und die genaue Detektion des Randbereiches, dessen Intensität etwa $1/250$ der Intensität des Zentrums beträgt. Dies könnte mit Hilfe hochauflösender und zugleich hochsensitiver Digitalkameras erfolgen.

Die experimentelle Überprüfung des hier dargestellten Verfahrens muß Gegenstand weiterer Forschung sein.