

# **Eine Schrittmotor-Steuerung zur Aufnahme von volumetrischen Daten am Mikroskop. Mechanisches, elektronisches und Software-Design sowie Beispiele für 3D-Rekonstruktionen**

von H. G. Adelman, Leverkusen

## **Einführung**

Bilder, die im konventionellen Mikroskop betrachtet und aufgenommen werden, sind im allgemeinen zweidimensional, wohingegen das Objekt selbst in der Regel dreidimensional ist. Der Mikroskopiker fokussiert daher immer wieder hin und her, um sich so einen Eindruck von dem dreidimensionalen Erscheinungsbild des Objektes zu verschaffen. Dies ist manchmal ausreichend, um einen groben Überblick zu erhalten, jedoch ist diese Vorgehensweise ungeeignet, um das Objekt in einer Vollständigkeit und Detailliertheit zu erfassen, die ein wirkliches Formverständnis ermöglicht. Es wurden daher schon früh Anstrengungen unternommen, um die guten 3D-Abbildungseigenschaften eines Stereomikroskopes auch höher vergrößernden Mikroskopen zur Verfügung zu stellen. Diese beinhalteten einfache Stereo-Adaptionen mittels polarisierenden Folien sowohl in der Brennebene des Kondensors als auch in den Okularen, um so Licht aus jeweils nur einer Hälfte der Kondensorapertur nur dem jeweils korrespondierenden Auge zuzuleiten und das entstandene Bild somit für das jeweils andere Auge zu sperren [1]. Es resultiert also eine kombinierte rechts/links azimutale Beleuchtung mit entsprechender schräger Abbildung, die aufgrund der verschiedenen Polarisation der beiden Strahlengänge nur jeweils einem Auge zugeführt wird. Aufwendigere Geräte verwenden zwei oder mehrere fokussierte schräge Beleuchtungsbündel, die einem speziellen Lampenhaus entspringen [2]. Dies ist der stereoskopischen Wahrnehmung der Objekte zwar dienlich, der beste Weg zur vollen Erfassung der volumetrischen Information eines Objektes stellt jedoch die dreidimensionale Rekonstruktion des Körpers aus einer Serie von zweidimensionalen Ebenen, optischen Schnitten, dar [3]. Diese Vorgehensweise birgt jedoch einige Probleme bzw. Nachteile. Zunächst kann es natürlich kein Echtzeit-Verfahren sein, denn schon die Erfassung von Bildern in verschiedenen Schärfeniveaus (ganz abgesehen von der nachfolgenden 3D-Rekonstruktion) braucht seine Zeit und somit ist diese Methode nicht auf bewegte Objekte anwendbar. Ein weiteres Problem ist die Überlagerung der einzelnen Schärfeniveaus mit unscharfer Bildinformation aus den Ebenen darüber und darunter. Auch die Tiefenschärfe der höchstauflösenden Objektive ist in der Regel noch größer als der ihrer Vergrößerung nach erwünschte Abstand zwischen den Ebenen [4]. Diese Kontamination der jeweiligen Bildebene durch unscharfe Information wird bei dem konfokalen Prinzip [5] unterdrückt, wo nur Licht aus der jeweiligen Fokusebene die

konfokale Blende passieren und zur Bildentstehung beitragen kann. Auch gibt es verschiedene und gut begründete mathematische Ansätze (»Dekonvolution«), die auf rechnerischem Wege erfolgreich die extrafokalen Bildanteile eliminieren [3], bevor eine dreidimensionale Objektrekonstruktion erfolgt. Der vorliegende Aufsatz beschreibt die Konstruktion einer Vorrichtung zur Aufnahme von volumetrischen Daten (Stapel einzelner Bildebenen) für die nachfolgende dreidimensionale Rekonstruktion des Objektes. Die mechanische Anpassung wurde für ein Leitz ORTHOPLAN entworfen, kann aber im Prinzip so abgeändert werden, daß sie an nahezu jedes Forschungsmikroskop paßt, welches nicht schon von Hause aus mit einer präzisen motorischen Fokusverstellung ausgerüstet ist. Weiterhin werden einige Ergebnisse zur 3D-Rekonstruktion gezeigt, welche mit kommerziell erhältlicher Software erstellt wurden. Die mathematische Dekonvolution wird ebenfalls in der Diskussion angesprochen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die jeweils interessierende Objektebene in den Fokus zu bringen. Das konfokale (Fluoreszenz-)Mikroskop bedient sich hierzu der Kombination aus Scanningspiegeln zur Bewegung des fokussierten Anregungslichtes und einer hierzu konfokalen kleinen Blende vor dem Detektor und ermöglicht so nur Licht aus der aktuellen Fokusebene zum Detektor und somit zur Bildentstehung zu gelangen. Im übrigen ist es möglich, entweder den Tisch oder das Objektiv relativ zum Objekt zu bewegen, um so nacheinander mehrere Objektebenen in den Fokus zu bringen. Manche Hersteller bieten Piezo-Vorrichtungen an [6], die entweder das Objektiv oder das Präparat bewegen. Diese Lösung ist sehr genau und hervorragend reproduzierbar, jedoch recht teuer und aufwendig – aber wohl die beste Lösung für höchste Ansprüche an Vergrößerung bzw. Auflösung. Eine einfachere und dennoch leistungsfähige Lösung ist die Verwendung eines präzisen, hochauflösenden Schrittmotors am Feintrieb des Mikroskopes [7], vorausgesetzt die mechanische Tischverstellung ist sehr exakt und so gut wie spielfrei, was z. B. auf das Leitz ORTHOPLAN zutrifft.

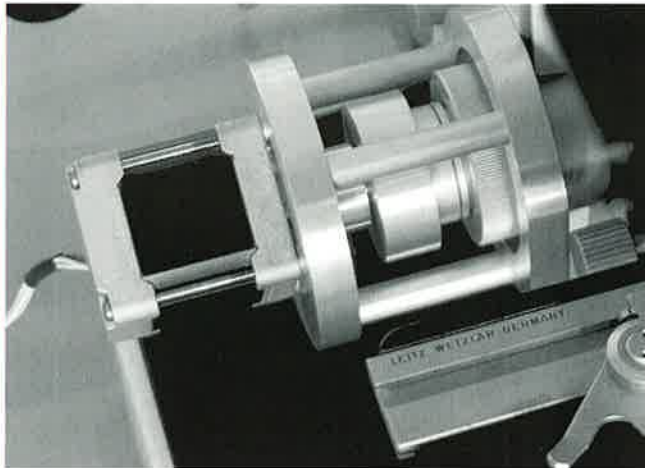


Abb. 1a: Mechanische Anpassung des Schrittmotors an das Leitz ORTHOPLAN.

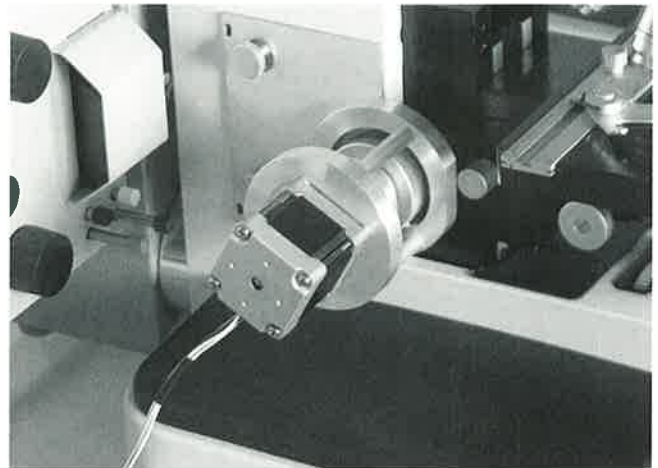


Abb. 1b: Details der mechanischen Anpassung.

**Mechanisches Design der Schrittmotoranpassung**

Das ORTHOPLAN-Mikroskop ist gut zur Aufnahme des erwähnten Schrittmotors an seinem Feintrieb vorbereitet. Zumindest die Stative neueren Datums haben an der linken Stativseite oberhalb des Fokustriebes zwei Gewindelöcher, die normalerweise mit Madenschrauben verschlossen sind. Eine Metallplatte wurde entworfen, die an der linken Stativseite mittels der beiden Schrauben befestigt wird und ihrerseits wiederum die Haltevorrichtung für den Schrittmotor trägt. Diese besteht aus einem Käfig, welcher den Schrittmotor trägt und die Kupplung zum Feintrieb beherbergt (Abb. 1). Die Konstruktion als offener Käfig gestattet dem Bediener weiterhin den manuellen Zugang zum Feintrieb, auch bei angesetztem Schrittmotor. Die Kupplung ist ein Metallzylinder, welcher sich über den Feintriebknopf stülpt. Sie enthält einen dünnen Streifen Moosgummi, welches einen guten und spielfreien Kraftschluß bewerkstelligt, jedoch noch so flexibel ist, um einen minimalen Versatz bzw. unterschiedliche temperaturbedingte Ausdehnungen der Motorachse und der Feintriebachse auszugleichen.

**Elektronisches Design der Schrittmotorsteuerung**

Verwendet wurde ein Schrittmotor der Firma Nanotec GmbH, Finsing bei München, mit den folgenden technischen Daten:

Typ:	4H4009 L01
Spannung:	12 V
Strom pro Wicklung (4 Wicklungen):	0,4 A
Haltemoment:	21 Ncm
Drehwinkel pro Schritt:	0,9° (= 400 Schritte/Umdrehung im Vollschrittmodus)
Gewicht:	300 g
Größe (L x B x T):	40 x 40 x 45 mm

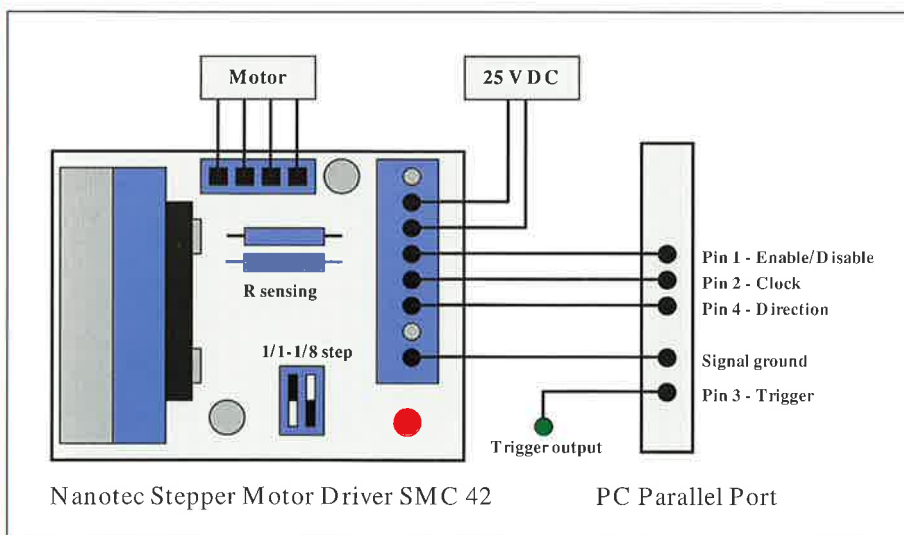


Abb. 2: Verdrahtung zwischen der parallelen Schnittstelle des PC und der Schrittmotorsteuerung.

Die Schrittmotoransteuerung, Typ SMC 42, wurde ebenfalls von Nanotec bezogen. Es handelt sich hierbei um ein kleines und handliches, integriertes Modul, welches einfach zu verdrahten ist und das entweder direkt oder mittels zwischengeschalteten Optokopplern an den PC angeschlossen werden kann (z. B. an eine der parallelen Schnittstellen). Als Grundeinstellung wurde der Halbschrittmodus mit 800 Schritten pro Umdrehung mittels Steckbrücken am Steuermodul gewählt. Für den Fall des Leitz ORTHOPLAN (100 µm/Umdrehung des Feintriebknopfes) kann somit eine minimale Tischbewegung von 125 nm erreicht werden. Die Verdrahtung zwischen der parallelen Schnittstelle des Computers und der Motorsteuerung ist in Abb. 2 dargestellt.

### Maschinennahe Steuersoftware

Der Programmcode zur Motorsteuerung befindet sich in einer Windows<sup>®</sup> DLL (dynamic link library), einer Programmbibliothek, welche zur Laufzeit in den Rechnerpeicher geladen wird. Sie besteht aus mehreren einzelnen

Funktionen, welche die Steuerimpulse für den Motor erzeugen (Schrittimpuls, Drehrichtung, Motorstrom ein/aus zur Unterdrückung eventueller Vibrationen in den Pausen zwischen den Schritten). Weiterhin wird ein Triggersignal bereitgestellt, um weitere Hardwaresteuerungen, beispielsweise den Start der Bildaufnahme durch einen externen Framegrabber, zu ermöglichen. Obwohl die DLL unter der Programmiersprache C erstellt wurde, sind die Kernbefehle jeder Funktion in Maschinensprache ausgeführt, um einen direkten und schnellen Zugang zu den Schnittstellenregistern zu haben. Weiterhin ermöglicht ein direkter Zugriff auf den Timer-Chip des PC via BIOS-Interrupt der Steuersoftware die exakte Steuerung der Zeitabläufe, in weiten Grenzen unabhängig von der Art oder Taktfrequenz des verwendeten Prozessors. Ein Teil der Steuer-DLL ist als Programmcode in der Abb. 3 dargestellt.

```
int FAR PASCAL _export clock_sm(int time_factor)           // motor clock pulse
{
    int data_reg, cntrl_reg;

    _asm mov dx,37Ah;
    _asm in ax,dx;                                       /* read lpt1 control register */
    _asm mov cntrl_reg,ax;
    cntrl_reg=cntrl_reg|1;                               /* set databit 0 to high [strobe to low] to enable motor current */
    _asm mov dx,37Ah;
    _asm mov ax,cntrl_reg;
    _asm out dx,ax;
    delay((long)(10*time_factor));                       /* 10 msec delay */

    _asm mov dx,378h;
    _asm in ax,dx;                                       /* read lpt1 data register */
    _asm mov data_reg,ax;
    data_reg=data_reg|1;                                 /* set databit 0 [value: 1] to high for pos. clock slope */
    _asm mov dx,378h;
    _asm mov ax,data_reg;
    _asm out dx,ax;
    delay((long)(20*time_factor));                       /* 20 msec delay */
    data_reg=data_reg & 0xfe;                            /* set databit 0 [value: 1] to low for neg. clock slope */
    _asm mov dx,378h;
    _asm mov ax,data_reg;
    _asm out dx,ax;
    delay((long)(100*time_factor));                      /* 100 msec delay, give motor time to turn */

    _asm mov dx,37Ah;
    _asm in ax,dx;                                       /* read lpt1 control register */
    _asm mov cntrl_reg,ax;
    cntrl_reg=cntrl_reg & 0xfe;                          /* set bit 0 to low [strobe to high] to disable motor current */
    _asm mov dx,37Ah;
    _asm mov ax,cntrl_reg;
    _asm out dx,ax;

    return 1;
}
```

Abb. 3: Ausschnitt der Steuersoftware als Beispiel maschinennaher Programmierung der parallelen Schnittstelle.



### Design der Bedieneroberfläche

Die Programmoberfläche zur Aquisition volumetrischer Daten, das »Z-Axis Control« Programm, ist in Microsoft Visual Basic<sup>®</sup> geschrieben. Es ist als Modul konzipiert, welches auf der Oberfläche von Image-Pro Plus<sup>®</sup> aufsetzt, einer bekannten und verbreiteten wissenschaftlichen Bildbearbeitungs- und Bildanalyse-Software von Media Cybernetics, Silver Spring (USA). Dieses Modul (Abb. 4) ist recht bedienerfreundlich. Es erlaubt u. a. die manuelle Ausführung einzelner oder mehrerer Motorschritte oder die Abarbeitung einer zuvor erstellten Script-Datei (mit Startposition, Endposition, Anzahl und Abstand der Schritte sowie deren Zeitabfolge), die dann die vollautomatische »Tomographie« eines Objektes unter dem Mikroskop erledigt. Der Bediener kann weiterhin Software- oder Hardware-Trigger mit jeweils einstellbarer Verzögerung zum Steuern des jeweils verwendeten Framegrabbers definieren. Ich verwende einen Hamamatsu ARGUS-20<sup>®</sup>-Bildprozessor, ein SCSI-Bus-Framegrabber, welcher über einen Softwaretrigger die Aufforderung zur Bildaufnahme erhält. Das Z-Axis-Control-Programm erlaubt weiterhin die Vorgabe von Dateinamen und Zielverzeichnis um die Bildserien nach der Aufnahme automatisch auf der Festplatte des Rechners abzulegen. Durch die Möglichkeit, eine Script-Datei unter Angabe von Startposition, Endposition, Schrittzahl und -weite automatisch erstellen zu lassen, ist der gesamte Vorgang der »Tomographie« d. h. der Schichtung des Objektes vollautomatisch zu erledigen. Script-Dateien können auf Festplatte gespeichert und auch wieder von dort eingelesen werden.

### Ergebnisse

Abb. 5 zeigt einen Teil der Originalregistrierung einzelner Fokusebenen durch eine versilberte Nervenzelle (25 von insgesamt 67 Ebenen). Dieser Stapel aus individuellen Bildern kann nun vor der eigentlichen 3D-Rekonstruktion zur Entfernung von extrafokaler Information weiter bearbeitet werden (sog. »Dekonvolution«). In erster Näherung kann jedoch auch ein einfacher Hochpaßfilter (oder besser ein Bandpaßfilter zur Unterdrückung von Bildrauschen) angewendet werden, um die unscharfe und somit niederfrequente extrafokale Information zu entfernen. Bei dieser einfachen Vorgehensweise ist jedoch zu beachten, daß niederfrequente Bildinformation aus der Fokusebene selbst ebenfalls entfernt wird. Dennoch können auch mit dieser einfachen Technik dreidimensionale Bildrekonstruktionen vorbereitet werden, da die wichtigsten Bildinformationen – die höherfrequenten Kanten – erhalten bleiben [4].

Nach der Hochpaßfilterung bzw. nach Dekonvolution wird der Bildstapel in eine wissenschaftliche 3D-Rendering-Software importiert (Slicer<sup>®</sup> von Fortner Res., Sterling, VA, USA). Abb. 6 und 8 wurden mittels Slicer aus einem Bildstapel rekonstruiert, der zuvor mittels einer relativ simplen Dekonvolutionsmethode, dem sog. »nearest neighbour« Algorithmus [4] bearbeitet wurde. Nach dem Import des Bildstapels wird die Z-Achsen-Ausdehnung des Datensatzes entsprechend der Tiefenausdehnung des Objektes eingegeben. Die Daten liegen nun als

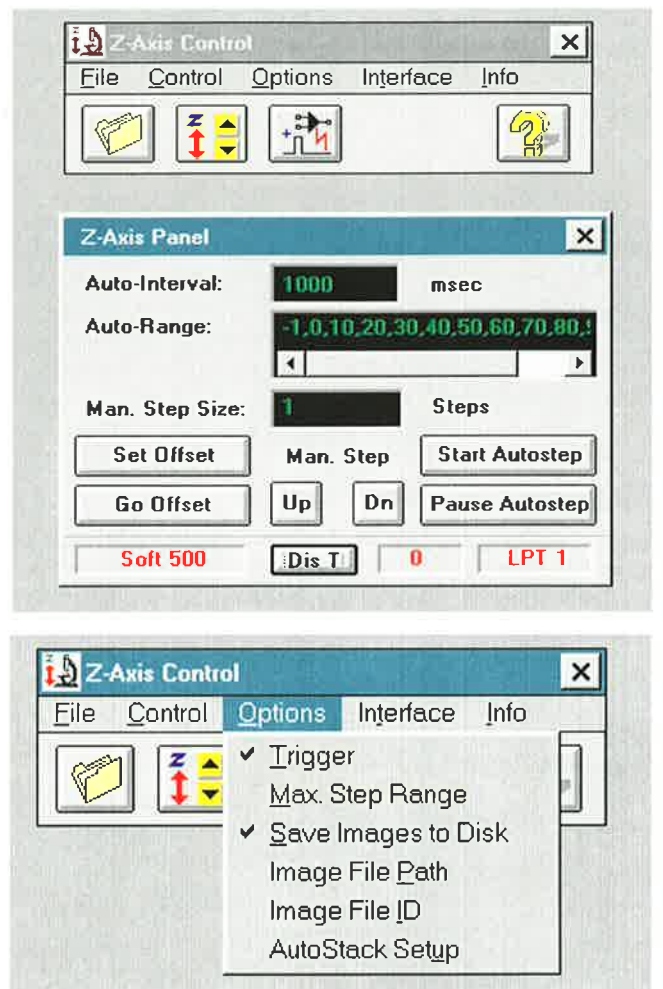


Abb. 4: Das Z-Axis-Control-Modul. Startfenster, Kontrollfenster und das Options-Menü sind dargestellt.

Block einzelner Pixel (»Voxel« = volume pixel) vor (Abb. 7). Innerhalb der Slicer-Software kann nun ein Teil des Blocks transparent gesetzt werden, der Block wird somit quasi erodiert, um tieferliegende Strukturen, in diesem Falle den Zellkörper, sichtbar zu machen (Abb. 6).

Eine Beleuchtungsoption ist ebenfalls verfügbar. Der Block kann gezoomt sowie in jede nur denkbare Raumlage gebracht werden, um den Datensatz von allen Seiten betrachten zu können. Das Rendern zweier Ansichten, wenige Grade auseinander, ergibt z. B. ein Stereobildpaar (Abb. 8). Das Objekt kann auch angeschnitten werden, um tieferliegende Strukturen sichtbar zu machen (Abb. 9). Eine Pseudokolorierung erleichtert oft die Unterscheidung von Graustufen.

Weiterhin erlaubt diese Software das Erstellen von XZ- und YZ-Schnitten durch den Voxelblock (Abb. 10) sowie das Erzeugen bewegter Animationen als Video für Windows<sup>®</sup>- (\*.AVI-)Dateien. Diese Animationen sind mittels Slicer recht einfach zu erstellen, da man nur sog. Keyframes, d. h. Schlüsselansichten manuell rendern muß (im einfachsten Falle nur die erste und die letzte Ansicht). Dann gibt man noch die Anzahl der dazwischen liegenden Ansichten ein (20 Ansichten pro Sekunde erzeugen schon

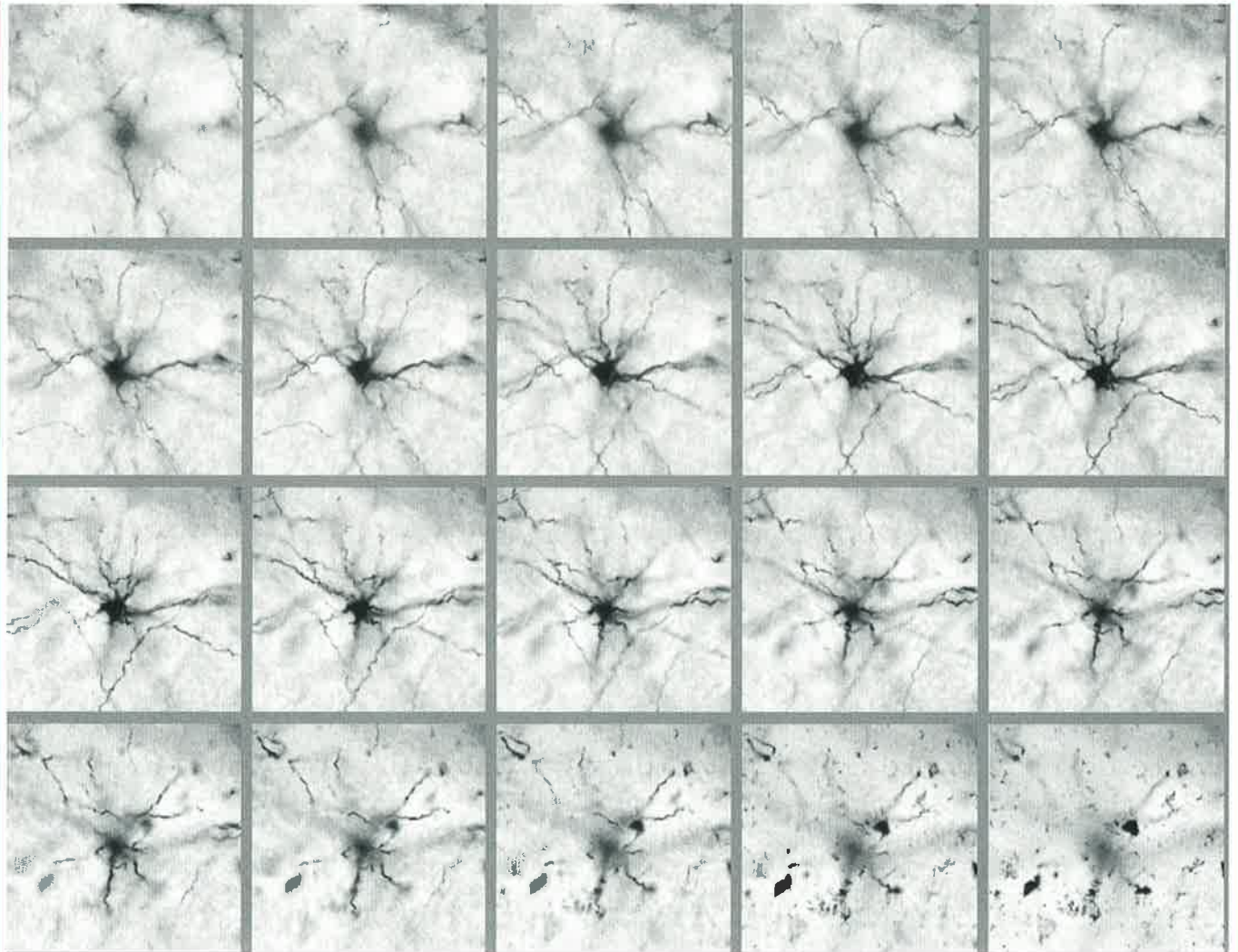


Abb. 5: Teil eines Stapels von insgesamt 67 Bildern.

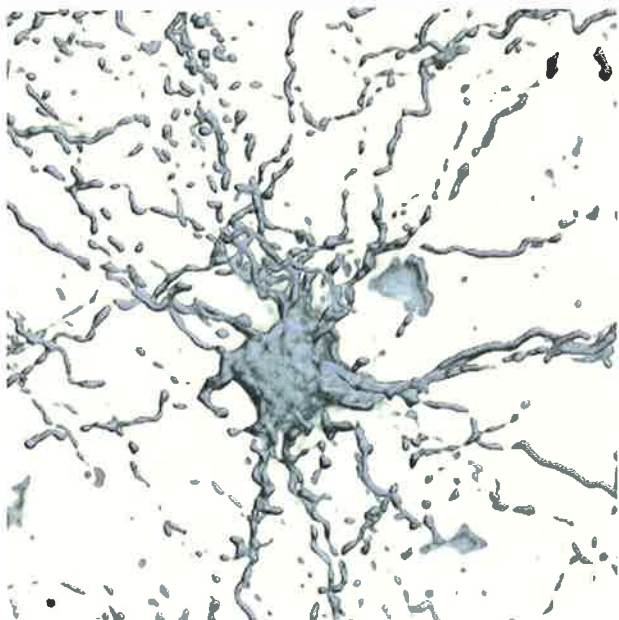


Abb. 6: Gerenderter Datensatz, transparent und mit Beleuchtung gezeigt.

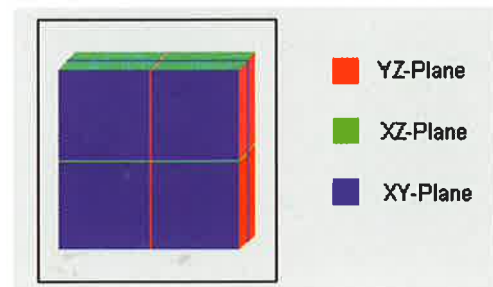


Abb. 7: Orientierung des Voxelblocks.

eine flüssige Animation). Slicer erzeugt nun selbsttätig alle zwischen den Keyframes liegenden Ansichten, was je nach Rechner und Datensatz bis zu einigen Stunden dauern kann. Danach werden die erstellten Bilder automatisch zu einem Videofile verbunden. Es sind ganz besonders diese bewegten Animationen, die viel zum Verständnis der dreidimensionalen Struktur des gerenderten Objektes beitragen. Leider ist das Weitergeben solcher bewegter Information im Rahmen der vorliegenden Publikation aus technischen Gründen nicht möglich.



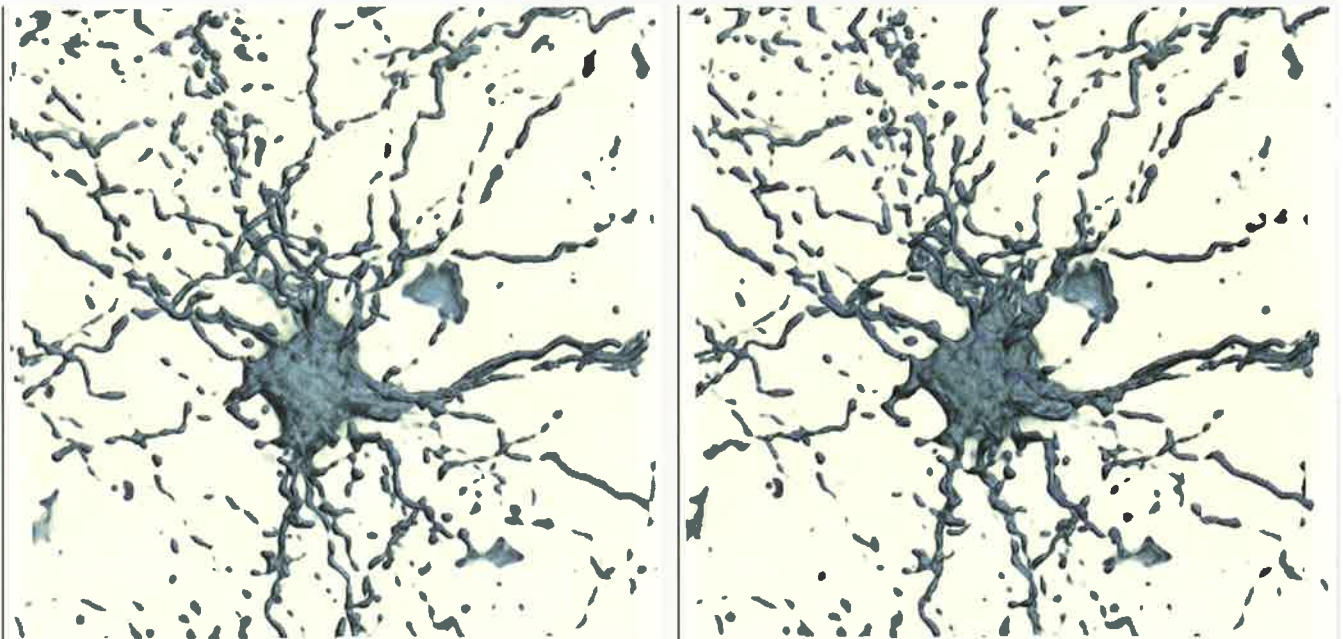


Abb. 8: Stereo-Bildpaar.



Abb. 9: Gezoomte Ansicht eines teilweise erodierten Voxelblocks des oben schon gezeigten Zellkörpers mit Anschnitt. Strukturen, die in der Tiefe des Objektes liegen, können unter Beibehaltung des 3D-Eindrucks des Objektes sichtbar gemacht werden.

### Diskussion

Verschiedene motorische Einrichtungen sind zur automatischen Bewegung des Mikroskoptisches möglich. Ein Schrittmotor ist eine preiswerte Alternative, die einfach anzusteuern ist und – abhängig von seiner Präzision – ein zuverlässiges Gerät zur Steuerung der Aufnahme volumetrischer Daten am Mikroskop darstellt [7]. Eine weitere Möglichkeit stellt z. B. ein tachometergesteuerter Gleichstrommotor dar, wie er von *Shaw et al.* [8] verwendet wird. Eine hochpräzise Alternative ist die Verwendung eines Piezo-Stellgliedes, um entweder das Objekt oder das Objektiv zu bewegen. Piezokristall-Stellglieder für diesen Zweck sind jedoch teuer, schwieriger anzusteuern und erfordern in der Regel einen höheren mechanischen Anpassungsaufwand am Mikroskop. Sie sind durch eine unerreichte Präzision und Reproduzierbarkeit gekennzeichnet, allerdings erlauben sie nur geringe totale Auslenkungen. Im Vergleich zu motorischen Anbauten an der Mikrometerschraube des Mikroskopes erlauben Piezo-Stellglieder darüberhinaus noch die exzellente Kalibrierung der Z-Translation und sind darüberhinaus frei von Hysterese. Piezo-Stellglieder sind in der einschlägigen Literatur genannt und werden auch in kommerziell erhältlichen 3D-Mikroskopiesystemen verwendet [6].

Hardware-Ansteuerungen über die parallele Rechner-schnittstelle sind generell unproblematisch unter DOS, Windows 3.x sowie unter Windows 95 zu realisieren.

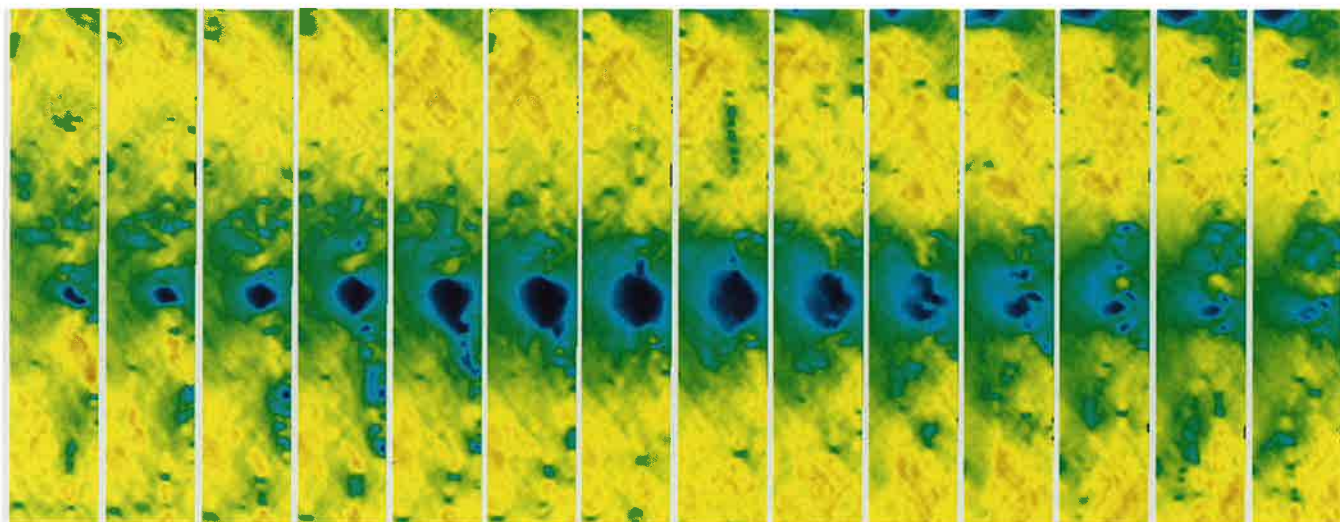


Abb. 10a: YZ-Schnitte durch den Voxel-Block.

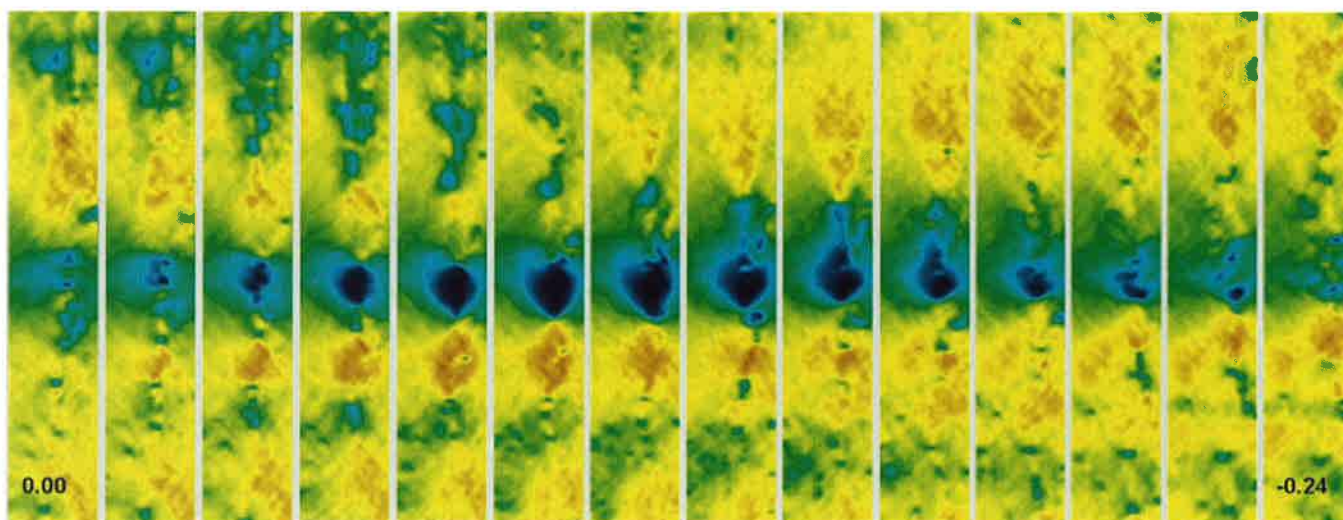


Abb. 10b: XZ-Schnitte durch den Voxel-Block.

Unter diesen Betriebssystemen sind die Schnittstellen direkt z. B. mittels der Programmiersprachen C und Assembler anzusprechen [9]. Dies ist jedoch nicht der Fall unter Windows NT, wo das Betriebssystem generell Benutzerprogrammen den direkten Zugriff auf die Hardwarekomponenten des Rechners verbietet. Man ist also gezwungen, hier spezielle NT-Hardwaretreiber selbst zu schreiben, was nicht trivial ist. Daher ist Windows NT nicht als erste Wahl für die hier besprochenen Steueraufgaben anzusehen. Allerdings gibt es Möglichkeiten, NT einen an der parallelen Schnittstelle angeschlossenen Drucker hardwaremäßig zu simulieren und dann dem vermeintlichen Druckerobjekt Daten zu senden, aber diese Lösungen liegen jenseits der Fragestellungen dieses Aufsatzes. Alternativ – mit höherem elektronischen Aufwand – kann die serielle Schnittstelle verwendet werden.

Dieser Artikel soll ebenfalls nicht die komplizierten Algorithmen und Prozeduren der Dekonvolution und der 3D-Rekonstruktion im Detail erläutern. Eine gute Übersicht hierzu findet sich in *Shaw* [10]. Ein interessanter Ansatz zur sogenannten »blinden Dekonvolution« findet sich im Aufsatz von *Holmes et al.* [11].

### Schlußfolgerung

Der vorliegende Aufsatz beschreibt einen recht einfachen, jedoch durchaus brauchbaren Ansatz zur Erfassung volumetrischer Daten an einem universellen Forschungsmikroskop mittels einem präzisen Schrittmotor. Die mechanische Anpassung ist als offener Käfig um den Fokusknopf angebracht, so daß dieser nach wie vor



manuell bedient werden kann. Die Steuerung des Motors durch einen PC ist mittels einer standardmäßigen Schrittmotorsteuerung und einigen Zeilen Programmcode elegant zu lösen, zumindest unter DOS, Windows 3.x und Windows 95. Eine Software wurde vorgestellt, die den Prozeß der »optischen Tomographie« inklusive Bilderfassung am Mikroskop weitgehend automatisiert. In Verbindung mit einem günstigen wissenschaftlichen Softwarepaket zur 3D-Rekonstruktion ist man in der Lage, die Wahrnehmung und das Verständnis räumlicher Objekte unter dem Mikroskop erheblich zu verbessern.

### Literatur

- [1] **Michel, K.:** Die Mikrophotographie, in : Wissenschaftliche und angewandte Photographie **10**, Vienna, New York, 1967.
- [2] **Foster, B. M.:** A high-resolution 3-D microscope opens the door to true color, real-time, large depth of field imaging, American Laboratory, 59–63, April 1995.
- [3] **Agard, D. A.:** Optical sectioning microscopy: Cellular architecture in three dimensions, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **13**, 191–219, 1984.
- [4] **Castleman, K. R.:** Digital image processing, Prentice-Hall, NJ, USA, 1979, 1996.
- [5] **Van der Voort, H. T. M, A. W. M. Smeudlers:** Acquisition, processing and visualization of three-dimensional confocal images, in: Electronic Light Microscopy (D. Shotton, ed.), Wiley-Liss, New York, 1993.
- [6] CELLscan™ system by Scanalytics, a division of CSPI, Billerica, MA, USA.
- [7] **Agard, D. A., J. W. Sedat:** Three-dimensional architecture of a polytene nucleus, Nature **302**, 21, 676–681, 1983.
- [8] **Shaw, P. J., D. A. Agard, Y. Hiraoka and J. W. Sedat:** Tilted view reconstruction in optical microscopy, Biophys. J. **55**, 101–110, 1989.
- [9] **Link, W.:** Messen – Steuern – Regeln über die Parallel-Schnittstelle des PC, Franzis, Munich, 1994.
- [10] **Shaw, P. J.:** Computer Reconstruction in Three-Dimensional Fluorescence Microscopy, in: Electronic Light Microscopy (D. Shotton ed.), Wiley-Liss, New York, 1993.
- [11] **Holmes, T. J., Y-H. Liu, D. Khosla, D. A. Agard:** Increased depth of field and stereo pairs of fluorescence micrographs via inverse filtering and maximum-likelihood estimation, J. Microscopy **164** Pt 3, 217–237, 1991.

*Anschrift des Verfassers:  
Dr. med. Holger G. Adelman, Alt-Steinbücheler Weg 9c,  
D-51377 Leverkusen.*