

**Aus dem Institut für Biomedizinische Optik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Robert Huber**



„Zeitcodierte Ramanmikroskopie mittels Faserlaser“

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Hubertus Hakert

aus Mülheim an der Ruhr

Lübeck 2022

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Robert Huber

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.06.2022

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die zeitcodierte stimulierte Ramanmikroskopie (engl. Time encoded, TICO) wurde erstmalig für unterschiedliche biologisch relevante Proben angewendet. Die Funktionalität des Aufbaus wurde in mehreren Bereichen erweitert: Der verwendete Pump laser wurde mit polarisationserhaltenden Faserkomponenten und einer neuen rauscharmen Laserdiode als initiale Startlaserquelle umgebaut. Ein neuer, rauscharmer 1300 nm FDML-Laser wurde implementiert. Die elektronische Programmierbarkeit der Laserquellen erlaubt eine gezielte Aufnahme der charakteristischen Ramanbanden einer Probe, was als „sparse sampling“ bezeichnet wird. Die Aufnahmezeit wird verringert bei Erhaltung der Spezifität. Durch die ~10-fach schnellere Aufnahme-Geschwindigkeit bedingt, wurde ein magnetische getriebener Linearschlitten verbaut, sodass eine Linienrate von 88 Hz erreicht werden konnte. Die technischen Änderungen und das neue Aufnahmekonzept benötigten umfassende Änderungen der Aufnahmesoftware.

Von den Bildgebungsergebnissen der Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polystyrol (PS) Kugeln ausgehend, wurden klassische TICO-Aufnahmen sowie Aufnahmen mit einer merkmalsorientierten spektralen Abdeckung für Gefrierschnitte von humaner Kopfhaut, Schweinehirn, humaner Nasenmuschel und tumorösen Gewebeproben der Hypopharynx durchgeführt. Für die Validierung der TICO-Raman Spektren wurden spontane Ramanspektren desselben Gewebes aufgenommen. Die spontanen Ramanspektren bestätigen die Lage und den spektralen Verlauf der TICO-Raman Spektren. Pixelintegrationszeiten von 24 μs (=42 kHz) für einen einzelnen spektralen Punkt konnten im CH-Streckbereich (2800-3100 cm^{-1}) erreicht werden, wobei sich die Integrationszeit im Fingerprintbereich (400-1800 cm^{-1}) auf 48 μs verdoppelt. Die Pixelintegrationszeiten sind in Bezug auf die einzelnen Anwendungen 5-20-fach langsamer als die weltweit schnellsten SRS-Systeme [1].

Durch die hohe Qualität der TICO-Daten konnten die Rohdaten für die Kontrastierung genutzt werden. Erste Ergebnisse bei der Verwendung multivariater Analysemethoden wie der Hauptkomponentenanalyse bestätigen die spektrale Ramansignatur der TICO-Raman Rohdaten und erlauben in Abhängigkeit der Probe einen besseren Ramankontrast.

Die hohe Informationsdichte der spontanen Ramanspektren außerhalb des abgedeckten spektralen Bereichs sowie die multivariaten Auswerteverfahren geben einen Ausblick für weitere TICO-Raman Anwendungen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	i
2	Einleitung	1
3	Grundlagen	8
3.1	spontane Ramanstreuung	8
3.1.1	Physikalische Darstellung	8
3.1.2	Streuquerschnitte und Signalstärke	10
3.2	Stimulierte Ramanstreuung	11
3.2.1	Physikalische Darstellung	11
3.2.2	Signalstärke und Signal-Rausch-Verhältnis	14
3.3	Ramanspektrum	16
3.3.1	Relevante Ramanbanden in biologischem Gewebe	17
3.3.1.1	Fingerprint-Bereich	18
3.3.1.2	Stiller Bereich des Ramanspektrums	21
3.3.1.3	CH Streckschwingung	22
3.4	Zeitcodierte Ramanmikroskopie: TICO-Raman	23
3.4.1	Prinzip	23
4	Experimenteller Aufbau	26
4.1	Spontanes Ramanmikrospektrometer	26
4.2	Laserlichtquellen des TICO-Ramansystems	30
4.2.1	Pumpquelle.....	30
4.2.1.1	Seed-Pulse-Erzeugung	31
4.2.1.2	Ytterbium dotierte Faserverstärker	32
4.2.1.3	Doppelmantel Ytterbium dotierter Faserverstärker	37
4.2.2	FDML-Laser.....	41
4.2.2.1	1300 nm FDML-Laser	43
4.2.2.2	1500 nm FDML-Laser	45
4.3	TICO-Ramansystem	48
4.3.1	Strahlengang.....	48
4.3.2	Probennavigation	50
4.3.3	Detektionsschema: Balancierung	53
4.3.4	Rauschcharakteristik und Sensitivität	55
4.3.5	Synchronisierung	56

4.3.5.1	Wellenformen.....	57
4.3.6	Zeitbasierte Wellenzahlberechnung	58
4.3.7	Sparse Sampling	60
5	<i>Bildgebung: Ergebnisse und Diskussion</i>	62
5.1	Signaloptimierung und Referenzproben	62
5.1.1	Signaloptimierung mithilfe des Ramansignals einer PMMA-Scheibe	62
5.1.2	Schmale Ramanbanden im Fingerprintbereich	63
5.1.3	Ramanmikroskopie von PS- und PMMA-Kugeln.....	64
5.1.4	Merkmalsorientierte Abtastung für die Ramanmikroskopie.....	66
5.2	Ramanmikroskopie an biologischem Gewebe	70
5.2.1	Humane Haut.....	70
5.2.1.1	TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich.....	71
5.2.1.2	Spontane Ramanspektroskopie.....	76
5.2.2	Schweinehirn	78
5.2.2.1	TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich.....	78
5.2.2.2	Spontane Ramanspektroskopie.....	84
5.2.3	Nasenmuschel.....	86
5.2.3.1	TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich.....	86
5.2.3.2	Fingerprint TICO-Raman Aufnahmen.....	94
5.2.3.3	Spontane Ramanspektroskopie und PCA-Analyse	98
5.2.4	Hypopharynxkarzinom.....	102
5.2.4.1	TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich.....	102
5.2.4.2	Fingerprint TICO-Raman Aufnahmen.....	108
5.2.4.3	Spontane Ramanspektroskopie und PCA-Analyse	109
5.3	SRS-Mikroskopie mittels DFB-Dioden	113
6	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	115
7	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	121
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	124
9	<i>Eigene Publikationen</i>	130
10	<i>Betreute Arbeiten</i>	131
11	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	132
12	<i>Lebenslauf</i>	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>
13	<i>Danksagung</i>	135

2 EINLEITUNG

Die Ramanstreuung beschreibt einen inelastischen Streuprozess von Licht, der erstmals 1928 experimentell nachgewiesen wurde von den indischen Physikern Raman und Krishnan [2]. Die Raman gestreuten Photonen haben eine veränderte Energie, was auf die An- bzw. Abregung der Vibrations- und Rotationsniveaus der Moleküle zurückzuführen ist. Die Energieänderung ist abhängig von den chemischen Bindungen des Moleküls und seinem Aufbau. Als Folge kann mit der Ramanstreuung ein chemischer Fingerabdruck (engl. Fingerprint) der Probe erstellt werden. Die Signalstärke des Raman gestreuten Lichts ist jedoch sehr schwach und liegt im Bereich von $\sim 10^{-6}$ der initialen Leistung des Lichts [3]. Erst die Erfindung des Lasers [4] hat die wissenschaftlichen Bemühungen weiter beschleunigt und den Einsatzbereich der Ramanstreuung erweitert. Bei Bestrahlung der Probe werden alle Raman aktiven Molekülbindungen der Probe spontan angeregt, sodass ein Spektrum gemessen werden kann, dessen Signal für jeden spektralen Punkt durch die an der Molekülbindung Raman gestreuten Photonen gegeben ist. Die spontane Ramanspektroskopie ist ein fest etabliertes Forschungs- und Anwendungsgebiet und wird flächendeckend in den Bereichen der Pharmazie [5], Materialwissenschaften [6], Kristallografie [7], Archäologie [8, 9], Sicherheitstechnik [10] und der Lebensmittelüberwachung [11] eingesetzt. Durch die geringe Signalstärke und den damit verbundenen langen Aufnahmezeiten einzelner Spektren ist der Einsatz der spontanen Ramanstreuung als bildgebendes Verfahren begrenzt. Schnelle spontane Ramansysteme erreichen Pixelintegrationszeiten von bis zu 50 ms in nicht biologischen Proben wie Graphen und Polymeren [12]. Für biologische Proben können Integrationszeiten von $\sim 0,5$ - $1,5$ s erreicht werden [13]. Trotz der hohen Aussagekraft der Ramanspektren stellen die langen Aufnahmezeiten ein wesentliches Problem der spontanen Ramanspektroskopie dar.

Für die Verstärkung der spontanen Ramanstreuung können kohärente Ramanprozesse genutzt werden. Hierbei werden zwei Laserquellen eingesetzt, deren Differenzfrequenz der Frequenz einer Raman aktiven Molekülbindung entsprechen muss. Die kohärente Anti-Stokes-Ramanstreuung (engl. coherent anti stokes Raman scattering, CARS) [14, 15] ist ein nicht-linearer vier Wellen Mischprozess (engl. four wave mixing, FWM), der eine schnelle Bildgebung erlaubt und sich durch die Blauverschiebung des Ramansignals gegenüber den eingestrahlten Wellenlängen von den anderen kohärenten Ramantechniken abgrenzt. Ein weiterer nichtlinearer Ramanprozess ist die stimulierte Ramanstreuung (SRS), welche erstmals von Eckhardt et. al. 1962 in organischen Lösungen beobachtet wurde [16]. Die stimulierte Anregung einzelner Molekülbindungen führt zu einem höheren Signal und erlaubt einen praktikablen Einsatz in der Bildgebung, was jedoch für die Anregung und Detektion zu komplexeren Ramansystemen führt. Für SRS kann der stimulierte Ramanverlust (engl. stimulated Raman loss, SRL) oder die stimulierte Ramanverstärkung (engl. stimulated Raman gain, SRG) genutzt werden. Beide Kanäle enthalten dieselbe Ramaninformation, da sie auf die Intensitätsänderung der beiden Anregungswellenlängen, durch die Anregung der vibratorischen Ramanniveaus zurückgehen.

Der Forschungsbereich der stimulierten Ramanmikroskopie und sein Anwendungsfeld wächst¹. Besonders die große Spezifität, ohne die Notwendigkeit, externe Marker einzusetzen, grenzt die Raman-Techniken von anderen Bildgebungsmodalitäten, wie zum Beispiel der Fluoreszenzbildgebung ab. In der biomedizinischen Optik ist die Kontrastierung von Gewebe als Diagnostikgrundlage ein wesentlicher Schwerpunkt. Besonders in der Krebsdiagnostik und der postoperativen Beurteilung der Resektionsränder ist die Histopathologie ein zentraler Bestandteil und basiert auf der Beurteilung spezifisch eingefärbter Gewebeschnitte. Die Herstellung der histologischen Schnitte ist oft komplex und kann bis zu 48 Stunden in Anspruch nehmen [17], wohingegen die stimulierte Ramanmikroskopie vergleichbare Ergebnisse in wenigen Minuten erzeugen kann [18-25].

Für Fluoreszenzanwendungen ist durch die Überlappung der Fluorophor-Emissionsspektren die Anzahl der gleichzeitig detektierbaren Fluoreszenzkanäle begrenzt. Die spektrale Breite von Ramanbanden ist kleiner und erlaubt eine Trennung von sich überlappenden Fluoreszenzspektren durch spezielle Ramanmarker [26], wobei der Hauptvorteil des chemischen Marker-freien Kontrasts in dieser Ramanhybridanwendung verloren geht. Im Allgemeinen kann die SRS-Mikroskopie eine Vielzahl von Ramanbanden in kurzer Zeit messen, deren Signale mannigfaltig verarbeitet werden können, ohne die Notwendigkeit, verschiedene Farbstoffe einzusetzen. Der einmal aufgenommene hyperspektrale Datensatz kann im Anschluss beliebig und mehrfach ausgewertet werden und steht durch die einfache Probenvorbereitung für weitere Verfahren zur Verfügung.

Potenziell ist keine Anfertigung von Dünnschnitten notwendig. Die Fokussierung des Laserlichts für die benötigte mikroskopische Auflösung und die nichtlineare Erzeugung der stimulierten Ramanstreuung führt zu einer hohen lateralen sowie axialen Auflösung [22, 27, 28]. Nachteilig ist die kohärente Erzeugung der stimulierten Ramanstreuung für die epi-Detektion. Ein Großteil des Signals propagiert in Ausbreitungsrichtung der eingestrahnten Lichtfelder. In dicken Proben wird durch Mehrfachstreuung mehr Licht in die rückwertige Richtung gestreut, welches detektiert werden kann [29]. Entsprechend ist für die epi-Detektion die Verwendung von Objektiven mit einer hohen Numerischen Apertur (NA) besonders geeignet. Proben mit einem hohem Ramansignal wie Haut- und Hirngewebe [19, 29-31] sowie Pharmazeutika [32] erhöhen außerdem die Signalhöhe. Spezielle, um das Objektiv angebrachte Ringdioden können zusätzlich eingesetzt werden, um die Lichtausbeute zu erhöhen, was zu Aufnahmegeschwindigkeiten im Videoratenbereich führt [29].

¹ Zwischen 2012-2016 wurden auf Google-Scholar 936 Treffer für „stimulated Raman scattering microscopy“ gefunden. Im Zeitraum von 2017-2021 wurden für dieselbe Suchanfrage 2000 Treffer gefunden. Die Suchanfrage wurde am 02.08.2021 durchgeführt.

Die kohärenten Raman-Techniken sind folglich vielversprechende Verfahren, die eine Vielzahl der Anforderungen moderner biomedizinischer Mikroskopiesysteme erfüllen. Die große Mächtigkeit bedingt jedoch komplexe Systeme und die Wahl geeigneter Proben, um mit etablierten Methoden wie der Fluoreszenz-Bildgebung Schritt halten zu können.

Die wesentlichen Parameter für die Beurteilung eines SRS-Systems sind die Aufnahmegeschwindigkeit, das Signal zu Rausch Verhältnis und die spektrale Abdeckung des Systems. Die spektrale Abdeckung eines SRS-Systems ist maßgeblich von den verwendeten Laserquellen abhängig, weil die Differenzfrequenz der beiden Laserwellenlängen gleich der Frequenz einer Raman-aktiven Molekülbindung für die Anregung sein muss. Entsprechend muss ein Laser abstimmbar oder spektral breit sein. Die Laserquelle mit längerer Wellenlänge wird im Allgemeinen als Abtast- oder Stokes-Laser bezeichnet. Die nichtlineare Erzeugung des SRS-Prozesses erfordert hohe Intensitäten, die durch gepulste Lasersysteme bereitgestellt werden und als Ramanpumpe oder Pump Laser bezeichnet werden.

Aktuell nutzen viele SRS-Mikroskopiesysteme entweder Titan:Saphir-Laser (Ti:Sa-Laser) [22, 33-35] oder Neodym- und Ytterbium-dotierte Festkörperlaser, mit einem zusätzlichen optisch parametrischen Oszillator (OPO) [18, 19, 21, 36], um die benötigten Wellenlängenpaare für den Ramanprozess zu erzeugen. In der Forschung sind Ti:Sa-Lasersysteme und OPOs weit verbreitet. Ihr Einsatz in der Industrie und besonders im klinischen Umfeld ist wesentlich kleiner. Anschaffungskosten, Platzbedarf, die Temperaturempfindlichkeit und die Anfälligkeit gegenüber Dejustage haben zur Folge, dass geschultes Personal und geeignete Räumlichkeiten für den störungsarmen Betrieb nötig sind. Die Abstimmrate der Laser bestimmt, wie schnell die nächste Ramanbande abgetastet werden kann. OPOs ändern ihre Wellenlänge durch Änderung der benötigten Phasenanpassungsbedingung. Dies wird üblicherweise durch eine geänderte Temperatur oder Orientierung des nichtlinearen Kristalls umgesetzt. Ti:Sa-Laser nutzen oftmals auf Doppelbrechung basierende Filter innerhalb des Resonators. Durch Verkippen des Filters wird die Wellenlänge geändert. Unabhängig von den genannten Verfahren sind die Abstimmungsgeschwindigkeiten gering, sodass für den Insight DS 3+ von Spectra-Physic 50 nm/s angegeben werden (OPO-System). Die Repetitionsrate ist fest im Bereich von 70-100 MHz mit Pulslängen im Femto- bis Pikosekundenbereich [37]. Durch das Zeitbandbreitprodukt miteinander verknüpft, bestimmt die Pulslänge die spektrale Auflösung des SRS-Systems. Die spektrale Halbwertsbreite der Ramanbanden variiert zwischen bestimmten Wellenzahlbereichen. Im hochspezifischen Fingerprint-Bereich zwischen 400-1800 cm^{-1} haben die Ramanbanden eine spektrale Breite von 10-20 cm^{-1} , wobei die sich überlagernden Streckenschwingungen der CH-Gruppe im Bereich von 2800-3100 cm^{-1} spektrale Halbwertsbreiten von bis zu $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$ aufweisen [38].² Für unterschiedliche Ramananwendungen müssen daher bestimmte Mindestanforderungen für die spektrale Auflösung gegeben sein, um eine

² Die spektrale Halbwertsbreite von 100 cm^{-1} im CH-Streckbereich ist durch die Überlappung vieler Raman-Banden der CH-Gruppe in diesem Bereich gegeben. Einzelne Raman-Banden weisen durchaus spektrale Halbwertsbreiten von $< 50 \text{ cm}^{-1}$ auf.

gleichzeitige Anregung mehrerer Ramanbanden auszuschließen. Im CH-Streckbereich wurde eine Auflösung von $\sim 50 \text{ cm}^{-1}$ als ausreichend demonstriert [38] und sogar eine Signalzunahme bei niedrigen spektralen Auflösungen beobachtet, da hier das Signal über die gesamte Breite der Ramanbande integriert wird [39]. Unabhängig vom Bereich des Ramanspektrums wird eine spektrale Auflösung $< 20 \text{ cm}^{-1}$ als ausreichend angesehen [40]. Mit den initialen Femtosekunden-Laserpulsen der zuvor diskutierten Laserquellen lässt sich eine spektrale Auflösung von 20 cm^{-1} nicht umsetzen. Als Folge haben sich in den letzten Jahren Verfahren etabliert, um einerseits eine höhere spektrale Auflösung mittels Femtosekundenpulsen zu erreichen und andererseits die spektrale Breite dieser Pulse für die Änderung der Energiedifferenz zwischen Pumpen- und Abtastlaser für die SRS-Erzeugung zu nutzen. Eine Möglichkeit, mittels Femtosekundenpulsen Ramanspektren aufzunehmen wird über ein variables zeitliches Delay zwischen linear gestreckten Femtosekunden Laserpulsen umgesetzt [41-45]. Dieses als „spectral focusing“ bezeichnete Konzept ermöglicht Aufnahmen mit einer Auflösung von 10 cm^{-1} im Fingerprintbereich [46].

Für das Signal Rausch Verhältnis (engl. signal to noise ratio, SNR) spielt neben den Laserquellen auch die Detektionseinheit eine wesentliche Rolle. Besonders im Hinblick auf schnelle Bildgebungsgeschwindigkeiten ist ein hohes SNR unabdingbar. Das untere Limit der Sensitivität ist hierbei durch die Schrot-Rausch-Grenze gegeben. Ein prominentes Detektionskonzept, um die Messung am Schrotrauschlimit zu gewährleisten, basiert auf der Modulation des Abtastlasers: Hierbei wird in Abhängigkeit der Intensitätsmodulation des Abtastlasers der Intensitätsverlust des Pumplasers durch SRL gemessen. Diese mit fester Frequenz vorliegende Änderung der Pumplaserintensität wird nach der Photodiode mit einem Lock-In-Verstärker detektiert [40]. Problematisch bei dieser Technik ist Laserrauschen im Bereich der Modulationsfrequenz des Abtastlasers [47]. Für einzelne spektrale Punkte unter Verwendung der zuvor beschriebenen Laserquellen lassen sich Pixelintegrationszeiten von $1-5 \mu\text{s}$ für einige Proben im CH-Streckbereich umsetzen. Im Fingerprintbereich sind die Ramansignale kleiner, sodass sich die Pixelintegrationszeit auf $\sim 10 \mu\text{s}$ erhöht [41, 42, 48].

Neben dem Einsatz von Festkörperlasern nutzen einige der bereits zuvor zitierten Arbeiten eine Kombination aus Faserlasern und Festkörperlasern [41, 42]. Zudem gibt es Konzepte, die ausschließlich Faserlaser nutzen [40, 49, 50].

Vor allem die Klasse der Faserlaser hat sich in den letzten Jahren als praktische und kosteneffiziente Alternative in vielen Bereichen der stimulierten Ramanmikroskopie etabliert. Kompakt, wartungsarm und kosteneffizient zu produzieren, können Faserlaser die benötigten Spitzenleistungen einiger Kilowatt für SRS Systeme erzeugen. Nichtlineare Effekte innerhalb der Faser³ müssen bei der Auslegung sorgfältig beachtet werden. Die für die spektrale Auflösung benötigten Pulslängen im

³ Raman und Brillouin Streuung und weitere Effekte wie Selbstphasenmodulation sowie Vier-Wellen-Mischen limitieren die Leistung von Faserlasern.

Pikosekundenbereich ermöglichen eine problemlose Propagation in Glasfasern. Die Lichtausbreitung in Fasern vereinfacht den klinischen Einsatz durch ihre Flexibilität und die geringe Anzahl benötigter optischer Komponenten.

Das im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelte Ramansystem nutzt Faserlaser zum Pumpen und Abtasten des SRS Prozess. Als Pumplaser wird ein Master-Oszillator-Leistungsverstärker (engl. master oscillator power amplifier, MOPA) verwendet. Das Prinzip basiert auf der Verstärkung einer einzelnen modulierten Laserdiode als Masterszillator. Die Pulslänge und Repetitionsrate ist hierbei in einem großen Bereich beliebig wählbar, was die Flexibilität des Ramansystems erhöht und es erlaubt, unterschiedliche Aufnahmeprotokolle elektronisch umzusetzen. Als Abtastlaser wird ein abstimmbarer Fourier Domänen Moden gekoppelter (engl Fourier domain mode locked, FDML) Laser verwendet [51]. Ursprünglich für den Einsatz in der optischen Kohärenztomografie (OCT) entwickelt [52-55], können FDML-Laser für die SRS Mikroskopie eingesetzt werden. FDML-Laser ändern ihre Wellenlänge periodisch über eine Breite von bis zu 100 nm [54] mit einer Frequenz von bis zu 6 MHz [55]. Die Zentralwellenlänge kann bei 1060 nm, 1300 nm und 1550 nm liegen. Zur Aufnahme eines stimulierten Ramanspektrums muss der Pumplaser (MOPA) mit unterschiedlichen Wellenlängen des FDML-Lasers auf der Probe überlagert werden. Da die Wellenlänge des FDML-Lasers sich mit der Zeit ändert und das Verhältnis aus Zeit zu Wellenlänge bekannt ist, muss lediglich der Puls des Pumplasers sukzessive verschoben werden, um ein Ramanspektrum aufzunehmen. Das Ramansignal ist als Intensitätsänderung des Lichts der entsprechenden FDML-Wellenlänge gegeben. Als Folge ist das Ramansignal in der Zeit kodiert. Im Englischen als „time encoded“ bezeichnet, wird dieses Verfahren als TICO-Raman bezeichnet. Erfunden 2015 [56], erwiesen sich erste Experimente als vielversprechendes SRS-Konzept mit einigen Vorteilen gegenüber bereits etablierten Systemen. Der konsequente Einsatz von Faserlasern kann den Einsatz im klinischen Umfeld begünstigen und ermöglicht den potenziellen Einsatz in Endoskopen. Die Lasereigenschaften erlauben eine Messung am Schrotrauschlimit [57] mit einer variablen spektralen Auflösung, die im Minimum $< 1 \text{ cm}^{-1}$ ist. Die elektronische Synchronisation der verwendeten Laserquellen und der Detektionseinheit erlaubt die Erzeugung von variablen Aufnahmeprotokollen, um den wechselnden Anforderungen unterschiedlicher Ramananwendungen gerecht zu werden. Diese Eigenschaften motivieren TICO-Raman als ein vielseitiges SRS-Konzept für mannigfaltige Anwendungen im biomedizinischen und klinischen Kontext. Die Erstveröffentlichung aus 2015 hat diese Eigenschaften im biomedizinischen Kontext motiviert, aber keine Messungen an klinisch relevanten biologischen bzw. humanen Gewebeproben gezeigt. Spektren einer Mischung aus Cyclohexan, Benzol und Toluol sowie die Aufnahme eines in Olivenöl getauchten Dünnschnitts des braunen Storchenschnabel liefern den konzeptionellen Beweis für das TICO-Raman Konzept. Losgelöst von der biomedizinischen Aussagekraft sind die Ergebnisse beeindruckend und motivieren die Weiterentwicklung des Systems für biomedizinische Anwendungen. Für die Weiterentwicklung des Systems wurde der optische Aufbau angepasst, um den Anforderungen der weiterentwickelten Laserquellen zu genügen. Neben dem bereits implementierten Aufnahmeschema wurde die

merkmalsorientierte Abtastung des Ramanspektrums umgesetzt und erprobt. Ramanspektren weisen charakteristische Banden auf, deren Informationen ausreichend sind, um den gewünschten Kontrast zu erzeugen. Außerhalb der charakteristischen Banden ist entweder kein Ramansignal vorhanden oder der spektrale Verlauf erlaubt keine Unterscheidung zu anderen chemischen Verbindungen der Probe. Ein schnelles und elektronisch programmierbares Abtastprotokoll für die wichtigsten spektralen Merkmale einer Probe ist ein wesentlicher Vorteil von TICO-Raman und ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber anderen Ramansystemen. Das Verfahren wird als „Sparse Sampling“ [58] bezeichnet und nutzt die Vorteile der elektronischen Programmierbarkeit der Laserquellen..

Am prominentesten ist der Wellenzahlbereich zwischen 2800-3000 cm^{-1} . Die Streckschwingungen der CH_2 um 2845 cm^{-1} und die CH_3 Molekülbindung um 2930 cm^{-1} geben ein starkes Ramansignal, das durch die große Anzahl beim Aufbau von Lipiden und Proteinen gegeben ist. Besonders fetthaltiges Gewebe wie Haut- und Hirngewebe eignen sich als Probe für die SRS-Mikroskopie. Aufnahmegeschwindigkeiten mit bis zu 30 Bildern pro Sekunde im Videoratenbereich sind möglich für Anwendungen mittels CARS [59] und SRS [29]. Eine weitere Anwendung ist die Erzeugung von künstlichen Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) mittels des SRS-Signals. Die HE-Färbung ist ein Standardfärbeprotokoll, welches in der Histopathologie eingesetzt wird. Die Abgrenzung von Zellkernen erlaubt eine morphologische Untersuchung des Gewebes und ermöglicht, krankhafte Veränderungen des Gewebes zu beurteilen. Hierzu zählen vor allem Tumore, die oft zusätzlich mit immunhistochemischen Färbungen für die Feindiagnostik kombiniert werden [17]. Dieselbe Kontrastierung des Gewebes kann mit SRS erzeugt werden [20, 22-24]. Hierzu wird das Ramansignal der CH_2 Molekülbindung mit dem Ramansignal der CH_3 Molekülbindung kombiniert. Die Anwendung wird am erfolgreichsten für Hirngewebe eingesetzt. Der hohe Lipidanteil der weißen Hirnsubstanz kann gut von den proteinhaltigen Neuronen unterschieden werden [19, 60]. Neben den Anwendungen im CH-Streckbereich existiert der Fingerabdruckbereich (engl. Fingerprint region), der sich von 400-1800 cm^{-1} erstreckt. In diesem Bereich liegen eine Vielzahl von charakteristischen Ramanbanden, die hochspezifisch sind, und komplexere Kontraste des Gewebes erlauben. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Blauverschiebung von 10 cm^{-1} der Amide I Ramanbande bei 1660 cm^{-1} die Präsenz von Amyloid-Fibrillen im Hirngewebe von Mäusen kennzeichnet. Amyloid Fibrillen sind ein Indikator für neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer. Neben dem chemischen Kontrast durch die Ramanbanden können im Fingerprint Bereich strukturelle Informationen über die Probe gewonnen werden.

Dem letzten Absatz folgend, wurde für die Translation von TICO-Raman in das biomedizinische Umfeld zuerst Gewebe mit einem hohen Ramansignal gemessen. Hierbei wurden für tierische Gewebestandteile die Gefrierschnitte eines Schweinehirns aufgenommen. Für humane Gewebeproben wurde ausgehend von Kopfhautbiopsien, gesundes Gewebe der Nasenmuschel sowie Krebsgewebe der Hypopharynx vermessen. Die Ramanmessungen wurden in zwei Bereichen des Ramanspektrums

durchgeführt. Der Großteil aller Veröffentlichungen im Fingerprint Bereich wird durch Anwendungen der spontanen Ramanspektroskopie gebildet. Dieser erste Einsatz von TICO-Raman an biologischen Proben im Fingerprint Bereich [1] sowie die Implementierung von Sparse-Sampling [58] sind wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit einem kommerziellen Ramanmikroskopmeter vermessen, dessen Ergebnisse die Erkenntnisse von TICO-Raman bestätigen. Neben dem einfachen Vergleich der Daten erlauben die Ergebnisse der spontanen Ramanspektroskopie einen Ausblick für zukünftige TICO-Raman Anwendungen zu geben und bilden die Grundlage für ein besseres Verständnis der aufgenommenen Ramanspektren.

3 GRUNDLAGEN

3.1 SPONTANE RAMANSTREUUNG

Die spontane Ramanstreuung stellt das physikalische Grundprinzip für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete kommerzielle Ramanmikrospektrometer dar. Erzeugung sowie Detektion stellen geringere Ansprüche an das System im Vergleich zu nichtlinearen Ramanapplikationen. Die große spektrale Abdeckung und die geringe Systemkomplexität machen die spontane Ramanstreuung zum vorrangig eingesetzten Prozess für Ramananwendungen.

3.1.1 Physikalische Darstellung

Spontane Ramanstreuung beschreibt die unelastische Streuung eines Photons an einem Molekül und ist als Energieschema in Abbildung 3-1 dargestellt. Im Vergleich zur Rayleigh-Streuung, die als elastische Streuung bezeichnet werden kann, ändert sich bei der spontanen Ramanstreuung die Energie des gestreuten Photons. Die Frequenzänderung des Raman gestreuten Photons ist auf die Energie einer Raman aktiven Vibrations- oder Rotationsmode ω_{vib} des Moleküls zurückzuführen. Im Fall der Anregung einer Raman aktiven Mode verliert das Pumpphoton mit der Frequenz ω_{pump} Energie und ist stokesverschoben⁴ zu ω_{stokes} . Analog kann eine Raman aktive Schwingungsmode bereits angeregt sein und die Energie auf das Pumpphoton übergehen, was zu einer Anti-Stokes⁵ Verschiebung mit neuer Frequenz $\omega_{\text{Anti-Stokes}}$ führt.

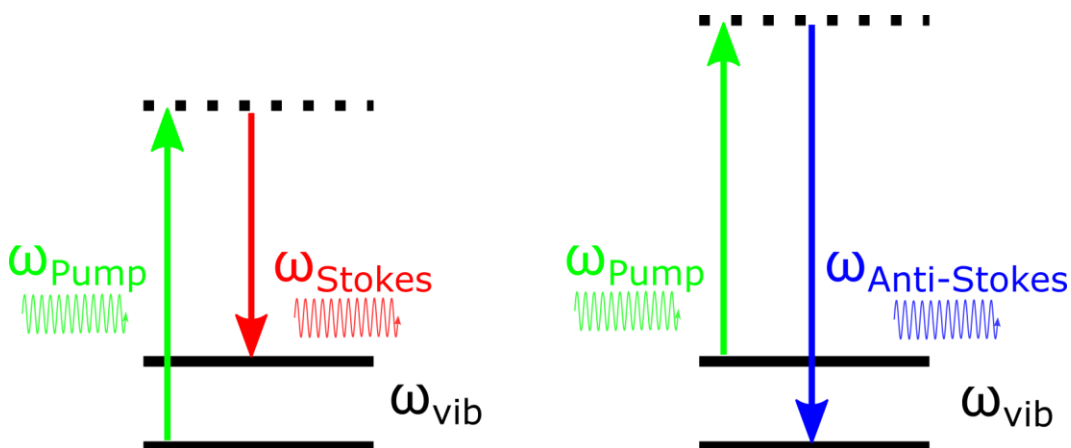


Abbildung 3-1: Energieschema der spontanen Ramanstreuung. Anregung der Raman aktiven Schwingungsmode Ω_{Raman} des Moleküls mit dem Pump-Photon der Frequenz ω_{pump} . Links: Anregung einer Schwingungsmode resultiert in Stokes-Verschiebung des Photons zu ω_{stokes} . Rechts: Ramanstreuung an einer bereits angeregten Schwingungsmode führt zu Energiegewinn mit einhergehender Anti-Stokes-Verschiebung zu $\omega_{\text{Anti-Stokes}}$.

⁴ Stokes-Verschiebung: $\omega_{\text{stokes}} = \omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{vib}}$

⁵ Anti-Stokes Verschiebung: $\omega_{\text{Anti-Stokes}} = \omega_{\text{pump}} + \omega_{\text{vib}}$

Bei Raumtemperatur befinden sich mehr Moleküle im Grundzustand im Vergleich zu Molekülen mit angeregten Vibrationsniveaus. Als Folge ist die Signalstärke des Stokes verschobenen Raman-Lichts größer als der Anti-Stokes-Anteil. Neben der Erklärung mithilfe von Abbildung 3-1 wird das klassische Modell herangezogen, um zusätzliche Grundlagen einzuführen, die aus [61] und [62] entnommen sind. Voraussetzung für die Erzeugung der Ramanstreuung ist die Polarisierbarkeit des Moleküls. Die Polarisierbarkeit beschreibt die Verschiebbarkeit von Ladungen und ist molekülspezifisch. Werden die für die Ramanstreuung verantwortlichen Eigenmoden des Moleküls nicht beachtet, folgen die Elektronen des Moleküls direkt der Oszillation des elektrischen Feldes des eingestrahlt Lichts. Das im Molekül induzierte Dipolmoment

$$\mu(t) = \alpha(t) \cdot E(t) \quad (3-1)$$

ist für kleine Feldstärken linear proportional zum elektrischen Feld $E(t) = Ae^{-i\omega_{\text{pump}}t}$ mit der Polarisierbarkeit $\alpha(t)$.⁶ In Wirklichkeit existieren zahlreiche Raman aktive Eigenmoden des Moleküls, die zu einer gestörten Oszillation des induzierten Dipols führen. Als Folge wird die Polarisierbarkeit um die Änderung der Schwingungsnormalkoordinate $q(t)$ durch den Beitrag der Eigenmoden des Moleküls erweitert⁷. Das induzierte Dipolmoment ändert sich zu

$$\mu(t) = \alpha_0 A e^{-i\omega_{\text{pump}}t} + A \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 q_0 (e^{i(\omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{vib}})t + i\phi} + e^{-i(\omega_{\text{pump}} + \omega_{\text{vib}})t - i\phi}) \quad (3-2)$$

, wobei $\alpha_0 A e^{-i\omega_{\text{pump}}t}$ die Rayleigh-Streuung darstellt. Der zweite Summand teilt sich mit $e^{i(\omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{vib}})t + i\phi}$ für die Anti-Stokes Ramanstreuung und mit $e^{-i(\omega_{\text{pump}} + \omega_{\text{vib}})t - i\phi}$ in die Stokes Ramanstreuung auf. Erwähnenswert ist, dass die Phase der Raman gestreuten Anteile der Phase der Eigenmoden des Moleküls entspricht. Im Gleichgewichtszustand sind die Eigenmoden des Moleküls nicht in Phase, was zu einem inkohärenten Prozess für die spontane Ramanstreuung führt und ihre Erzeugung in 4π Steradian erklärt. Im Umkehrschluss liegt im Fall der elastischen Rayleigh-Streuung ein kohärenter Prozess vor, da dieser nicht von den Phasen der Eigenmoden des Moleküls abhängig ist.

⁶ Polarisierbarkeit von $\alpha = \text{const}$ entspricht der Rayleigh-Streuung.

⁷ Polarisierbarkeit als Taylorentwicklung $\alpha(q) = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0} \right) * q_0 + \text{Terme höherer Ordnung}$ für die veränderte Schwingungsnormalkoordinate $q(t) = q_0 (e^{i\omega_{\text{v}}t + i\phi} + e^{-i\omega_{\text{v}}t - i\phi})$ durch die Eigenmoden des Moleküls.

3.1.2 Streuquerschnitte und Signalstärke

Das klassische Modell, welches die Ramanstreuung über die Polarisierbarkeit als Funktion mit der veränderten Schwingungsnormalkoordinate durch die Ramanmoden des Moleküls erklärt, soll um die Intensität der Ramanstreuung erweitert werden. Es wird nur die Stokes Ramanstreuung mit der Frequenz ω_{stokes} betrachtet. Der Anti-Stokes Anteil kann analog hergeleitet werden. Die Amplitude des elektrischen Felds des induzierten Dipols einer angeregten Ramanmode ist im Fernfeld entlang \mathbf{r} in skalarer Form:

$$E(\omega_{\text{stokes}}) = \frac{\omega_{\text{stokes}}^2}{4\pi\epsilon_0 c^2} |\mu(\omega_{\text{stokes}})| \frac{e^{ikr}}{r} \sin \theta \quad (3-3)$$

Hierbei ist k der Wellenvektor des ausgestrahlten Feldes, c die Lichtgeschwindigkeit, r die Distanz vom Beobachter zum Dipol, θ der Winkel im Bezug zur Achse des schwingenden Dipols, wobei $|\mu(\omega_{\text{stokes}})|$ die Amplitude des Dipols mit der Schwingungsfrequenz ω_{stokes} beschreibt. Um auf die Intensität der Raman-Stokes-Strahlung zu kommen, muss zuerst die Energieflussdichte entlang \mathbf{r} über den Poynting-Vektor beschrieben werden.

$$S(\omega_{\text{stokes}}) = \frac{\epsilon_0 c}{2} |E(\omega_{\text{stokes}})|^2 \quad (3-4)$$

Für die gesamte Energie des für die Ramanstreuung verantwortlichen Dipols, muss die Energieflussdichte aus Gleichung (3-4) über die Einheitskugel integriert werden. Unter Berücksichtigung von $|\mu(\omega_{\text{stokes}})|$ aus Gleichung (3-2) kann die Intensität der Stokes-Ramanstreuung als

$$I(\omega_{\text{stokes}}) = \frac{\omega_{\text{stokes}}^4}{12\pi\epsilon_0 c^3} q_0^2 |A|^2 \left| \frac{\delta\alpha}{\delta q} \right|^2 \quad (3-5)$$

geschrieben werden. Die Abhängigkeit der Ramanstreuung zur vierten Potenz der Frequenz kann unmittelbar aus Gleichung (3-5) abgeleitet werden. Außerdem lässt sich aus dem Betragsquadrat der Amplitude mit $|A|^2 = I_0$ schließen, dass die Intensität linear mit der Anregungs-Intensität skaliert und Ramanstreuung nur stattfinden kann, wenn $\left(\frac{\delta\alpha}{\delta q}\right) \neq 0$ ist.

Praktischer ist es, die Intensität der Ramanstreuung über den Streuquerschnitt des Moleküls auszudrücken. Mithilfe des Streuquerschnitts σ kann die Ramanintensität einer Probe der Länge z und der Anzahldichte eines Volumenelements N als

$$I(\omega_{\text{stokes}}) = Nz\sigma(\omega_{\text{stokes}})I_0 \quad (3-6)$$

ausgedrückt werden. Der Streuquerschnitt von Raman aktiven Molekülbindungen beträgt $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2$ im Vergleich zu Ein-Photonen-Fluoreszenz-Streuerquerschnitten von $\sim 10^{-16} \text{ cm}^2$ [63]. Obwohl eingehend angemerkt wurde, dass die Intensität des Anti-Stokes Anteils der Ramanstreuung analog hergeleitet werden kann, muss darauf hingewiesen werden, dass die Beschreibung der Ramanstreuung mithilfe der klassischen Physik Grenzen hat. Das Verhältnis zwischen Stokes- und Anti-Stokes-Anteil sowie die korrekte Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Molekül und eingestrahltm Lichtfeld lässt sich nur mithilfe der Quantenmechanik beschreiben. Darauf wird hier explizit verzichtet, da die klassische Beschreibung in der Regel einfacher zu verstehen ist und die nötige Theorie ausreichend abdeckt.

3.2 STIMULIERTE RAMANSTREUUNG

Die stimulierte Anregung der Ramanstreuung hat einige Vorteile, jedoch ist die Erzeugung und Detektion komplexer. Für Anwendungen in der Mikroskopie mit vielen Bildpunkten sind die Integrationszeiten bei der spontanen Ramanstreuung zu lang. Mehrstündige Aufnahmezeiten lassen einen praktischen Einsatz im biomedizinischen Kontext nicht zu. Hingegen lassen sich mithilfe der stimulierten Ramanstreuung (SRS) für einige spezielle Anwendungsfälle Aufnahmezeiten im Videoratenbereich realisieren. Im Allgemeinen wird SRS zu den kohärenten Ramanprozessen gezählt, welche nach der Erklärung über das Energieschema ausführlicher eingeführt wird.

3.2.1 Physikalische Darstellung

Im Vergleich zur spontanen Ramanstreuung wird im stimulierten Fall eine einzelne Ramanaktive Schwingungsmode des Moleküls angeregt. Das Energieschema wird hierzu um eine weitere Frequenz für die Anregung erweitert, vgl. Abbildung 3-2. Die Energiedifferenz zwischen dem Pumplichtfeld mit der Frequenz ω_{Pump} und dem Abtastlichtfeld mit der Frequenz ω_{Probe} entspricht der Energie einer einzelnen Raman aktiven Schwingungsmode des Moleküls mit der Frequenz ω_{vib} . Die resonante Anregung einer einzelnen Schwingungsmode sorgt für eine höhere Intensität der Ramanstrahlung. Das Ramansignal ist im Fall der stimulierten Ramanstreuung als Intensitätsänderung der eingestrahltm Lichtfelder gegeben. Es kann die stimulierte Ramanverstärkung (engl. Stimulated Raman gain (SRG)) des Abtastlichts oder die Intensitätsverringerng (engl. Stimulated Raman loss (SRL)) des Pumplichtes gemessen werden. Die stimulierte Anregung einer Schwingungsmode hat zur Folge, dass für die Aufnahme von Ramanspektren entweder eine der beiden Anregungswellenlängen geändert werden muss oder die Anregung der Schwingungsmoden breitbandig erfolgt.

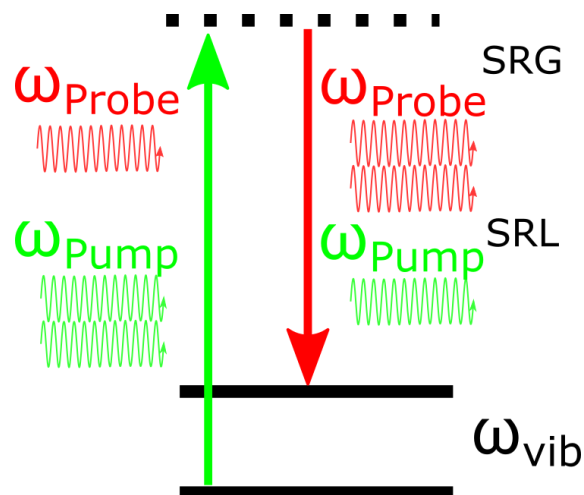


Abbildung 3-2 Energieschema der stimulierten Ramanstreuung. Zwei Lichtfelder werden auf der Probe überlagert. Energiedifferenz zwischen dem Pumplicht mit der Frequenz ω_{Pump} und dem Abtastlicht mit Frequenz ω_{Probe} entspricht der Energie einer Ramanaktiven Schwingungsmode des Moleküls mit der Frequenz ω_{vib} . Die Ramanstreuung ist als Intensitätsänderung der eingestrahnten Lichtfelder gegeben. Es lässt sich der Verlust des Pumplichts (engl. stimulated Raman loss (SRL)) oder die Verstärkung des Abtastlichts (engl. stimulated Raman gain (SRG)) messen.

Analog zu Kapitel 3.1.1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** wird das klassische Modell herangezogen, um die stimulierte Ramanstreuung (SRS) ausführlicher einzuführen. Wie zuvor folgt die Einführung den Herleitungen aus [61, 62]. Hierzu wird die Anregung einer Schwingungsmode durch die Bewegung des Moleküls als gedämpfter harmonischer Oszillator mit der Resonanzfrequenz ω_{vib} beschrieben. Die Oszillation kann wie im spontanen Fall durch die veränderte Schwingungsnormalkoordinate $q(t)$ des Moleküls ausgedrückt werden. Ausgehend von den zwei eingestrahnten Lichtfeldern

$$E_i(t) = A_i e^{-i\omega_i t} \quad (3-7)$$

mit $i = 1, 2$. Die Frequenzen ω_1 und ω_2 beschreiben die Pump- und Abtastfrequenz aus Abbildung 3-2 und sind größer als die Resonanzfrequenz des Oszillators. Die Elektronen der Molekülbindung können jedoch dem elektrischen Feld des Lichts folgen ohne eine Änderung der Schwingungsnormalkoordinate. Bei hohen Intensitäten kommen nichtlineare Anteile der Elektronenbewegung hinzu, die einen Einfluss auf die Schwingungsnormalkoordinate haben. Dies schließt die Schwebefrequenz ($\Omega = \omega_1 - \omega_2$) der beiden eingestrahnten Lichtfelder mit ein. Entsprechend wird eine oszillierende Kraft auf die Molekülbindung ausgeübt:

$$F(t) = \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q}\right)_0 [A_1 A_2^* e^{-i(\Omega)t}] \quad (3-8)$$

Ausgehend von Gleichung (3-8) kann mithilfe der Bewegungsgleichung⁸ für den harmonischen Oszillator die Amplitude der veränderten Schwingungsnormalkoordinate der Molekülbindung aufgestellt werden:

$$q(\omega_{vib}) = \frac{1}{m} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q}\right)_0 \frac{A_1 A_2^*}{\omega_{vib}^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} \quad (3-9)$$

Die Abhängigkeit von der Polarisierbarkeit mit $\left(\frac{\delta\alpha}{\delta q}\right) \neq 0$ ist nur für Schwingungen gegeben die symmetrisch zum Symmetriezentrum sind⁹. Außerdem ist die Stärke der Auslenkung $q(\omega_{vib})$ von den Amplituden der beiden eingestrahnten Lichtfelder abhängig. Die Auslenkung ist am größten, wenn die Schwebung der eingestrahnten Lichtfelder der Resonanzfrequenz der Raman aktiven Molekülbindung entspricht ($\Omega = \omega_{vib}$). Die zeitliche Änderung der Schwingungsnormalkoordinate mit der Frequenz der Raman aktiven Mode ω_{vib} ändert die Polarisation des Materials auf makroskopischer Ebene, was durch

$$P(t) = N \left[\alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q}\right)_0 q(t) \right] \{E_1(t) + E_2(t)\} \quad (3-10)$$

beschrieben wird. Die Polarisation des Materials ist durch alle N Moleküle gegeben. Der Anteil der linearen Polarisation ist durch α_0 gegeben, wobei $\left(\frac{\delta\alpha}{\delta q}\right)_0$ den nichtlinearen Teil dritter Ordnung der Polarisation darstellt. Die Schwebung von E_1 und E_2 sorgt für eine zeitlich geänderte Polarisation $P(t)$ des Materials. Einerseits führen die eingestrahnten Lichtfelder zu einer oszillierenden Polarisation im Material, andererseits erfahren die initial eingestrahnten Felder E_1 und E_2 die veränderte Polarisation des Materials. Entscheidend für die kohärente Ramanstreuung ist der nichtlineare Anteil der Polarisation.

$$P_{NL}(t) = P(\omega_{cs})e^{-i\omega_{cs}t} + P(\omega_2)e^{-i\omega_2t} + P(\omega_1)e^{-i\omega_1t} + P(\omega_{as})e^{-i\omega_{as}t} \quad (3-11)$$

⁸ $\frac{d^2q(t)}{dt^2} + 2\gamma\frac{dq(t)}{dt} + \omega_{vib}q(t) = \frac{F(t)}{m}$ mit γ = Dämpfungskonstante, m = reduzierte Masse des Oszillators, ω_{vib} = Resonanzfrequenz der Molekülbindung.

⁹ Antisymmetrische Schwingungen zum Symmetriezentrum sind IR aktiv und sind im Ramanspektrum verboten, was als Alternativverbot bezeichnet wird.

Dieser setzt sich aus unterschiedlichen Beiträgen zu einer Gesamtpolarisation zusammen, die sich durch ihre Frequenzen unterscheiden. Neue Beiträge, die aus der Kombination der initialen Frequenz der eingestrahlten Lichtfelder bestehen, sind die kohärente Stokes Frequenz $\omega_{cs} = 2\omega_2 - \omega_1$ und die kohärente Anti-Stokes Frequenz $\omega_{as} = 2\omega_1 - \omega_2$. Im Folgenden sind die einzelnen Anteile an der nichtlinearen Polarisation einzeln aufgeführt:

$$P(\omega_2) = 6\epsilon_0\chi_{NL}^*(\Omega)|A_1|^2A_2 \quad (\text{SRG}) \quad (3-12)$$

$$P(\omega_1) = 6\epsilon_0\chi_{NL}(\Omega)|A_2|^2A_1 \quad (\text{SRL}) \quad (3-13)$$

$$P(\omega_{cs}) = 6\epsilon_0\chi_{NL}^*(\Omega)A_2^2A_1^* \quad (\text{CSRS}) \quad (3-14)$$

$$P(\omega_{as}) = 6\epsilon_0\chi_{NL}(\Omega)A_1^2A_2^* \quad (\text{CARS}) \quad (3-15)$$

Auffällig ist, dass alle Polarisationskomponenten ¹⁰ von derselben nichtlinearen elektrischen Suszeptibilität¹¹ χ_{NL} abhängen:

$$\chi_{NL}(\Omega) = \frac{N}{6m\epsilon_0} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0^2 \frac{1}{\omega_{vib}^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} \quad (3-16)$$

Entsprechend ist die Amplitude der im Material induzierten Polarisation für alle genannten Ramaneffekte vergleichbar, da sie alle durch dieselbe Ramanmode mit der Frequenz ω_{vib} induziert werden. Dies schließt aber nicht ein, dass die Signalstärke aller Ramaneffekte gleich ist. Für die verwendete stimulierte Ramanverstärkung des Probenlichts mit der Frequenz ω_2 aus Gleichung (3-12) wird im nächsten Kapitel die Signalstärke sowie das Signal- Rausch-Verhältnis genauer betrachtet.

3.2.2 Signalstärke und Signal-Rausch-Verhältnis

Für die Signalstärke des SRG-Anteils wird die Veröffentlichung von Owyong et al. [64] herangezogen. Hier wird das Sensitivitäts-Limit für die stimulierte Ramanstreuung bei Verwendung von CW-

¹⁰ Für die Erklärung zu SRG, SRL siehe Abbildung 3-2. CARS engl. für Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CSRS engl. für Coherent Stokes Raman Scattering.

¹¹ Die elektrische Suszeptibilität $\chi^{(n)}$ ist ein Tensor höherer Stufe, dessen Einträge neben den vorgestellten Ramaneffekten weitere nichtlineare Effekte wie SHG (engl. second harmonic generation); FWM (eng. Four wave mixing), XPM (engl. cross phase modulation) etc. beschreibt.

Lichtquellen mit geringer Intensität beschrieben, was sich mit den verwendeten Intensitäten von wenigen mW und der CW-Charakteristik der verwendeten FDML-Laser deckt. Die Leistungsänderung des Probenlichts $P(\omega_{\text{probe}})$ durch SRG unter Berücksichtigung der Pump-Leistung $P(\omega_{\text{pump}})$ wird über folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\frac{\delta P(\omega_{\text{probe}})}{P(\omega_{\text{probe}})} \approx \frac{384\pi^4}{\lambda_{\text{pump}}\lambda_{\text{probe}}cn} \text{Im} \chi^{(3)}(-\omega_{\text{probe}}, \omega_{\text{probe}}, \omega_{\text{pump}}, -\omega_{\text{pump}}) P(\omega_{\text{pump}}) \quad (3-17)$$

Hierbei ist n der Brechungsindex für die Frequenz des Probenlichts mit der Wellenlänge λ_{probe} . Die Pumpwellenlänge ist durch λ_{pump} gegeben, wobei $\text{Im}\chi^{(3)}$ dem Imaginärteil der elektrischen Suszeptibilität dritter Ordnung entspricht. Die Änderung des Probenlichts durch SRG skaliert linear mit dem Imaginärteil der $\chi^{(3)}$ und der Pumpleistung $P(\omega_{\text{pump}})$ und gibt das Ramanspektrum direkt wieder. Die Näherung aus Formel (3-17) ist unabhängig von der Intensität im Fokus, wenn die Probedicke ein Vielfaches der Rayleighlänge des Fokus entspricht. Optische Prozesse, die auf $\chi^{(3)}$ basieren, benötigen Phasenanpassung, wobei für SRS eine Selbstanpassung der Phase vorliegt [64]. Für CARS-Anwendungen kann die Phasenanpassung über Objektive mit einer hohen NA erzeugt werden [15].

Betrachtet man das Signal-Rausch-Verhältnis für SRS aus [65]

$$SNR_{\text{SRS}} = \frac{2\text{Im}[\chi^{(3)}(\Omega)] I_{\text{pump}} I_{\text{probe}}}{\alpha I_{\text{probe}} + \sqrt{I_{\text{probe}}}} \xrightarrow{\alpha \rightarrow 0} 2\text{Im}[\chi^{(3)}(\Omega)] I_{\text{pump}} \sqrt{I_{\text{probe}}} \quad (3-18)$$

mit αI_{probe} für das Intensitätsrauschen und $\sqrt{I_{\text{probe}}}$ für das Schrotrauschen des Abtastlasers fällt auf, dass eine Messung am Schrotrauschlimit nur möglich ist, wenn das Intensitätsrauschen des Abtastlasers null ist ($\alpha \rightarrow 0$). Im späteren Verlauf der Arbeit wird aufgezeigt, wie das Balancierungskonzept im TICO-Ramansystem den Einfluss von Intensitätsrauschen des Abtastlasers so weit reduziert, dass eine Messung am Schrotrauschlimit möglich ist (vgl. Abschnitt 4.2.2.1 und Abschnitt, 4.3.3 für den Abtastlaser).

3.3 RAMANSPEKTRUM

In Ramanspektren wird die Intensität des Raman gestreuten Lichts gegenüber der Wellenzahl aufgetragen. In der Spektroskopie bezeichnet die Wellenzahl ν den Kehrwert der Wellenlänge λ und wird aus historischen Gründen in cm^{-1} angegeben, was der Anzahl der Wellenzyklen pro Zentimeter entspricht. Ramanspektren werden maßgeblich durch die Lage und Gestalt der einzelnen Ramanbanden klassifiziert. Einzelne Ramanbanden können bestimmten Molekülbindungen oder funktionalen Gruppen zugeordnet werden. Hierbei ist die Lage der Ramanbande, seine Höhe und der spektrale Verlauf keineswegs starr. Äußere Einflüsse, die übergeordnet als Milieu bezeichnet werden können, haben ebenso einen Einfluss, wie Veränderungen des molekularen Aufbaus. Im biomedizinischen Kontext sind maßgeblich krankhafte Veränderungen der Gewebeprobe zu nennen. Entzündungsreaktionen, Krebs oder bleibende Veränderungen nach Krankheiten oder Verletzungen haben einen Einfluss auf das Ramanspektrum. Außerdem ist die Position der Ramanbanden im Spektrum nicht gleichverteilt. Ramanspektren von Biomolekülen können in drei große Bereiche eingeteilt werden. Als Beispiel dient das spontane Ramanspektrum eines Hypopharynxkarzinom dargestellt in Abbildung 3-3.

Der erste Bereich umfasst das spektrale Fenster zwischen $400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ und wird als Fingerabdruckbereich (engl. Fingerprint region) bezeichnet und ist in Abbildung 3-3 rot eingezeichnet. Charakteristisch ist die hohe Anzahl disjunkter Ramanbanden, die neben den vorliegenden Molekülbindungen, auch strukturelle Informationen über die Probe enthalten. Dem Namen des Bereichs entsprechend, können mithilfe des Fingerprintbereichs Ramanspektren Molekülen zugeordnet werden.

Zwischen $1800-2800 \text{ cm}^{-1}$ (schwarzer Anteil in Abbildung 3-3) liegt der stille Bereich des Ramanspektrums. Wie in Abbildung 3-3 zu sehen, liegen in diesem spektralen Bereich keine Ramanbanden. Die Abwesenheit von Ramansignalen im stillen Bereich für Biomoleküle ermöglicht den gezielten Einsatz von Ramanmarkern, wie Alkinen und deuterierten Verbindungen. Einzelne Atome können durch Isotope ersetzt werden, die ein verändertes Ramansignal bewirken.

Das dritte spektrale Fenster liegt im Bereich zwischen $2800-4000 \text{ cm}^{-1}$ (blauer Anteil). Von besonders großer Bedeutung sind die Streckschwingungen der C-H-Molekülbindung von $2800 \text{ cm}^{-1}-3100 \text{ cm}^{-1}$. Durch ihre große Häufigkeit im Aufbau von Proteinen und Lipiden ist das Ramansignal hoch, was besonders für geschwindigkeitsoptimierte Ramanmikroskopie-Anwendungen ausgenutzt wird. Neben dem hohen Signal lassen sich Verhältnisse zwischen einzelnen Streckschwingungen der C-H Molekülbindung bilden, um Ramankontraste vergleichbar zu histologischen Färbungen wie der Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zu erzeugen [19, 21]. Im nächsten Kapitel werden ausgewählte Ramanbanden genauer beschrieben, da sie für die Kontrastierung des Gewebes im biomedizinischen Kontext eine wesentliche Rolle spielen.

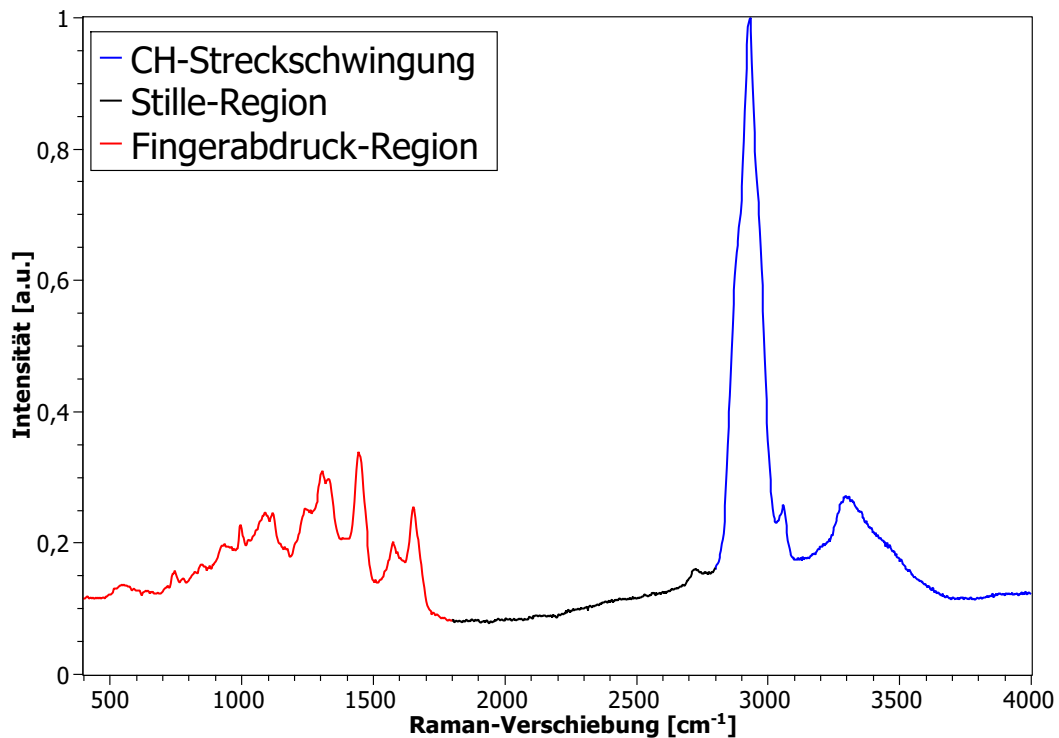


Abbildung 3-3 Spontanes Ramanspektrum eines humanen Hypopharynxkarzinoms. Das Spektrum lässt sich in drei große Bereiche einteilen (rot: Fingerprint Bereich von 400-1800 cm^{-1} , schwarz: stiller Bereich ohne Ramanbanden für Biomoleküle 1800-2800 cm^{-1} , blauer Bereich: Streckschwingungen von $\text{CH}_{2,3}$ und OH Molekülbindungen, 2800-4000 cm^{-1}). Der Fingerprint-Bereich zeichnet sich durch viele disjunkte Banden aus, die eine spezifische Zuordnung der Ramanspektren zu bestimmten Biomolekülen erlaubt sowie strukturelle Informationen über die Probe liefert. Im stillen Bereich müssen für Biomoleküle externe Marker eingebracht werden, um Ramantechniken anwenden zu können. Der Bereich der Streckschwingungen von $\text{CH}_{2,3}$ und OH erlaubt die Unterscheidung zwischen Lipiden und Proteinen. Das hohe Ramansignal erlaubt eine schnelle Bildgebung.

3.3.1 Relevante Ramanbanden in biologischem Gewebe

Für den Einsatz von Ramantechniken in der biomedizinischen Optik gibt es spezifische Banden die im Folgenden für die einzelnen Teilbereiche des Spektrums aufgelistet und erklärt werden. Neben Ramanbanden, die mit dem TICO-System gemessen wurden, werden Ramanbanden außerhalb des mit TICO-Raman abgedeckten spektralen Bereichs diskutiert. Diese Ramanbanden wurden mit dem spontanen Raman-Mikroskop vermessen und geben einen Ausblick für zukünftige TICO-Raman Anwendungen.

3.3.1.1 Fingerprint-Bereich

Mithilfe des Fingerprint-Spektrums aus Abbildung 3-4 werden die gekennzeichneten Ramanbanden eingeführt. Falls nicht anders benannt, sind die zugewiesenen Banden aus [66] entnommen. Die erste Ramanbande liegt im Bereich von $520-550\text{ cm}^{-1}$ und kennzeichnet die Streckschwingungen von Disulfiden (S-S), die in Proteinen Disulfidbrücken bilden und die Tertiär- und Quartärstruktur stabilisieren [67]. Zudem wird Cholesterol im Zusammenhang mit der Ramanbande bei 550 cm^{-1} genannt [68]. Für das Signal bei 746 cm^{-1} ist die proteinogene α -Aminosäure Valin verantwortlich. Aminosäuren sind die Grundbausteine von Polypeptiden und Proteinen. Weitere Ramansignale von Aminosäuren liegen bei 850 cm^{-1} für Tyrosin (Tyr) und bei 995 cm^{-1} für Phenylalanin (Phe). Das Ramansignal von Phenylalanin von 996 cm^{-1} - 1003 cm^{-1} wird für den Vergleich unterschiedlicher Ramanspektren für Proteine herangezogen. Hierzu werden die Spektren anhand der Phenylalanin Bande normiert [69]. Neben den zuvor beschriebenen Aminosäuren sind in Abbildung 3-4 die Ramansignale von Nucleinsäuren zu erkennen. Für das Ramansignal von 770 cm^{-1} - 785 cm^{-1} sind die Ringstrukturen von Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U) verantwortlich. Cytosin und Thymin sind Basen der DNS-Sequenz, wohingegen Uracil nur in der Ribonucleinsäure (RNS) vorkommt und dort Thymin ersetzt. Die Ramansignale bei 1308 cm^{-1} und 1334 cm^{-1} gehören zu den zwei verbleibenden Nucleinsäuren Adenin und Guanin, wobei sie auch der Deformationsschwingung der C-H Molekülbindung zugeordnet werden können, die charakteristisch für das Ramanspektrum von Proteinen sind. Anzumerken ist, dass die beiden Nucleinsäuren zweimal im Fingerprint-Spektrum aus Abbildung 3-4 vorkommen. Das Ramansignal bei 1574 cm^{-1} wird ebenfalls Adenin und Guanin zugeordnet. Wie zuvor, kann dasselbe Ramansignal auch zur Deformationsschwingung der C-H Molekülbindung gehören. Welches Ramansignal im Einzelnen für diesen Gewebetyp vorliegt, ist nicht der Anspruch dieses Kapitels, verdeutlicht aber die Komplexität der Ramanspektren und die Schwierigkeit, diese exakt zu interpretieren. Die Phosphodiesterbindung PO_2^{-3} im Bereich von $\sim 930 - 986\text{ cm}^{-1}$ bildet das chemische Rückgrat (engl. backbone) der DNS. Im selben spektralen Bereich kann die symmetrische C-C Streckschwingung für Proteine liegen.

Prominente Ramanbanden von Proteinen sind die Amide Gruppen. Vor allem die Amide I Gruppe um 1650 cm^{-1} wie in Abbildung 3-4 dargestellt, wird häufig für die Beurteilung von Ramanspektren unterschiedlicher Gewebeklassen herangezogen. Die verantwortliche Molekülbindung für das Ramansignal um 1650 cm^{-1} ist die Doppelbindung zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff (C=O). Die Position, der spektrale Verlauf und die Höhe lassen Schlüsse auf die Sekundärstruktur der Proteine zu. Krankhafte Veränderungen des Gewebes haben einen Einfluss auf die Proteinstruktur und können auch einen Einfluss auf die Signalstärke haben, wenn ein erhöhter Proteinanteil im Gewebe als krankhafte Veränderung vorliegt. Im Bereich der SRS-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Position der Amide I Bande mit dem Vorliegen von Amyloid-Fibrillen im Zwischenzellraum korreliert [48]. Eine erhöhte Konzentration der Amyloid-Fibrillen im Hirngewebe ist ein Krankheitsmerkmal von Alzheimer. Verantwortlich für die Blauverschiebung von 10 cm^{-1} für Amyloid-Fibrillen ist der erhöhte Anteil von

Proteinen in einer β -Faltblatt-Struktur, was für eine Protein-Missfaltung spricht. Weitere Beispiele für die Betrachtung der Amide I Bande sind im Bereich der spontanen Raman-Spektroskopie zu finden: Die Diagnose von Speiseröhrenkrebs mittels spontaner Raman-Spektroskopie im Fingerprintbereich nutzt unter anderem die Intensität der Amide I Bande [70]. Weitere Bereiche des Verdauungstrakts wie der Kehlkopf [71] und der Magen [72] nutzen die Amide I Bande, um Krebserkrankungen anhand veränderter Ramanspektren zu diagnostizieren. Im Allgemeinen kann die Position der Amide I Bande eine α -Helix-Struktur der Proteine anzeigen, wenn ihr Signal zwischen 1650 cm^{-1} - 1657 cm^{-1} liegt. Eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur im Bereich von 1612 cm^{-1} - 1640 cm^{-1} . Eine parallele β -Faltblatt-Struktur der Proteine liegt vor, wenn das Ramansignal im Bereich von 1626 cm^{-1} - 1640 cm^{-1} liegt. Bei einer ungeordneten Struktur der Proteine liegt das Amide I Signal im Bereich 1640 cm^{-1} - 1651 cm^{-1} [73]. Die Einteilung der Amide I Bande in die unterschiedlichen Strukturgruppen der Proteine kann sich für verschiedene Gewebetypen zu der vorhergehenden Einteilung unterscheiden [66]. Ebenfalls Raman aktiv, aber nur mit resonanten Raman-Verfahren zu beobachten, ist die Amide II Bande im Bereich um 1550 cm^{-1} [69], welche im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet wurde und nicht weiter behandelt wird. Komplementär zur Amide I Bande ist die Amide III Bande im spektralen Fenster zwischen 1230 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} . Die verantwortlichen Molekülbindungen sind die Streckschwingung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff (N-C) und die Wipp-Schwingung zwischen Stickstoff und Wasserstoff (N-H)[69]. Aus ihr lassen sich ebenfalls strukturelle Informationen der Proteine ableiten, welche die Interpretation der Amide I Gruppe unterstützen kann [74].

Neben Proteinen spielen Lipide eine wesentliche Rolle für den Aufbau und die Funktion vielzähliger biologischer Systeme. Entsprechend sind sie neben den Proteinen über das gesamte Ramanspektrum verteilt. In Abbildung 3-4 sind Ramansignale von Lipiden für die Einfachbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen (C-C) bei 1118 cm^{-1} sowie bei 1450 cm^{-1} für die CH_2 und die CH_3 Molekülbindungen [75, 76] zu erkennen.

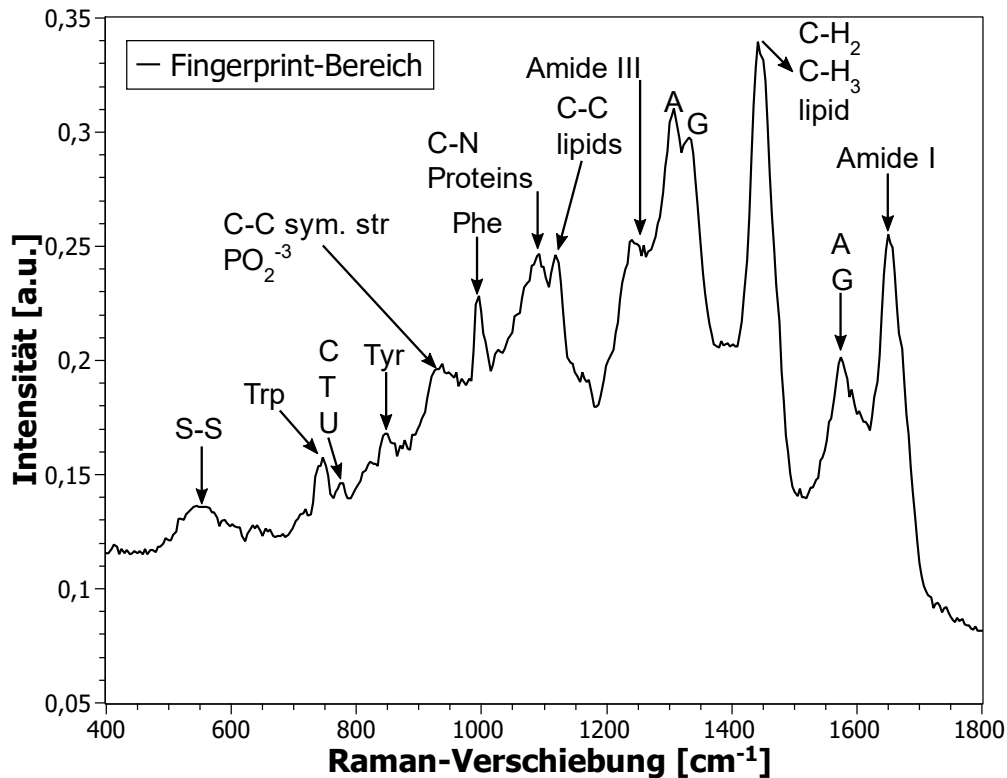


Abbildung 3-4 Spontanes Ramanspektrum eines humanen Hypopharynxkarzinoms im Fingerprint-Bereich von 400-1800 cm^{-1} . Disulfide (S-S) im Bereich um 550 cm^{-1} stabilisieren die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen. Viele Banden lassen sich mit Aminosäuren in Verbindung bringen: Tryptophan (Trp) 746 cm^{-1} , Phenylalanine (Phe) 995 cm^{-1} , Adenine und Guanin 1574 cm^{-1} und $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$. Amide III ($\sim 1275 \text{ cm}^{-1}$) und Amide I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) sind charakteristisch für Proteine und ihre Sekundärstruktur. Weitere Protein assoziierte Ramanbanden bei $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ und 950 cm^{-1} . Charakteristische Lipid-Banden liegen bei 1450 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} .

In Ramanspektren von Lipiden sind ebenfalls Signale um 1650 cm^{-1} zu finden, die im Kontrast zur Amide I Bande nicht auf die C=O Molekülbindung zurückzuführen sind, sondern aus der Streckschwingung der C=C Molekülbindung resultieren [76]. Ebenfalls im spektralen Fenster der Amide III Bande, aber nicht ihr zugehörig, sind die Ramansignale bei 1260 cm^{-1} die zur =C-H-Deformationsschwingung gehören. Ergänzend sind die Ramanbanden der C-C gauche Streckschwingung bei 1087 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} für die C-C Streckschwingung sowie die Ramansignale von $1720\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ zu nennen [76]. Die Ramansignale von $1720\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ sind charakteristisch für Lipide und lassen sich auf den Ester der Fettsäuren zurückführen.

Durch die Mehrfachzuweisung von Molekülbindungen zu unterschiedlichen Ramanbanden können mehrere Schlüsse gezogen werden: Die Komplexität von biologischen Proben erschwert eine einfache Zuweisung zu übergeordneten Gewebekomponenten wie Lipiden, Proteinen und der DNS anhand der Position der Ramanbanden. Alle Informationen des Spektrums müssen in die Analyse einbezogen werden, um eine valide Interpretation der Daten zu erhalten. Als Folge ist der Abgleich von Gewebespektren mit kommerziellen erhältlichen Datenbanken nicht geeignet, was bekräftigt wird durch die

Tatsache, dass in der Literatur wenig auf kommerzielle Datenbanken verwiesen wird. Raman-Datenbanken enthalten in der Regel Spektren von Reinstoffen und sind für Anwendungen außerhalb des biologischen Anwendungsfeldes erstellt worden.

Das Vorgeführte soll verdeutlichen, dass Ramanspektren eine Vielzahl von Merkmalen für die Analyse enthalten, ihre Interpretation jedoch ein eigenes Forschungsfeld darstellt und in dieser Arbeit nur am Rande eine Rolle spielen. Vielmehr sind die Ergebnisse der spontanen Raman-Spektroskopie als Benchmark für die Ergebnisse der TICO-Ramanmikroskopie zu sehen und geben einen Ausblick für mögliche Anwendungsfelder von TICO-Raman. Besonders die Fingerprint-Region ist wenig erforscht in Bezug auf Anwendungen mit kohärenten Raman-Techniken und rückt aktuell in den Forschungsfokus durch die immer bessere Technologie und Erfahrung des jungen Forschungsfelds der kohärenten Ramanmikroskopie.

3.3.1.2 Stiller Bereich des Ramanspektrums

Im spektralen Bereich zwischen $1800\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ liegen keine Ramanbanden innerhalb biologischen Gewebes. Dieser im Englischen als „cell silent region“ bezeichnete Bereich wird nutzbar durch externe Raman-Marker [77-80]. Der große Vorteil des chemischen Kontrasts ohne die Notwendigkeit der Anfärbung geht bei der Anwendung von Raman-Markern verloren. Vorteile kann das Markieren haben, wenn der Transport oder die Ansammlung von Stoffen in der mikroskopierten Probe vermessen werden soll. Diese Anwendung wird üblicherweise durch auf Fluoreszenz basierende Bildgebungsmodalitäten durchgeführt. Ein wesentlicher Nachteil der Fluoreszenz ist, dass die Anzahl der Fluoreszenzkanäle begrenzt ist, da sich das Fluoreszenzspektrum vieler Fluorophore überlagert und daher spektral nicht getrennt werden kann.¹² Eine neue Anwendung kombiniert Fluoreszenz und Ramanstreuung, um sich überlappende Fluoreszenzspektren anhand ihrer Raman-Signatur zu trennen [26]. Hierbei wurden unterschiedliche Isotope des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin-800 durch eine Nitril-Bindung ($\text{C}\equiv\text{N}$) gebildet, die sich lediglich im Ramanspektrum unterscheiden, was an PMMA-Folien und Kolibakterien gezeigt wurde.

¹² Eine weitere Möglichkeit Fluoreszenzsignale im selben spektralen Fenster zu unterscheiden, basieren auf der Lebenszeitsmessung der Fluorophore.

3.3.1.3 CH Streckschwingung

Der dritte Bereich des Ramanspektrums erstreckt sich von 2800 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} . Besondere Bedeutung hat der spektrale Bereich von 2800 cm^{-1} - 2975 cm^{-1} in dem Streckschwingungen der CH_2 und CH_3 Molekülbindungen liegen. Die hohe Anzahl dieser Molekülbindungen beim Aufbau von Proteinen und Lipiden resultieren in einer hohen Signalstärke und erlaubt eine schnelle Bildgebung mit Videoraten [29, 59, 81]. Der Anteil von CH_2 Molekülen ist in Lipiden höher als in Proteinen, wohingegen Proteine mehr CH_3 Moleküle enthalten [25, 40]. Das Spektrum lässt sich daher in zwei getrennte Kanäle zerlegen, was eine Differenzierung zwischen lipidhaltigem und proteinhaltigem Gewebe erlaubt. Die symmetrische Streckschwingung der CH_2 -Molekülbindung liegt um 2840 cm^{-1} . Die antisymmetrische Streckschwingung der CH_2 -Molekülbindung liegt bei 2880 cm^{-1} [76] und ist die Fermiresonanz der Methylengruppe (CH_2). Im Allgemeinen erstrecken sich die Ramanbanden der Methylengruppe (CH_2) von 2833 - 2888 cm^{-1} und die Methylgruppe (CH_3) von 2909 - 2967 cm^{-1} [76]. Eine weitere Raman-Signatur liegt bei $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ und ist auf die Streckschwingungen der $=\text{C-H}$ Molekülbindung zuzuordnen, die in ungesättigten Fettsäuren vorkommt [76]. Oberhalb der $\text{CH}_{2,3}$ -Gruppe liegt die Streckschwingung der O-H-Molekülbindung im spektralen Fenster von 3050 - 3800 cm^{-1} [82, 83]. Die OH-Bindung findet jedoch wenig Beachtung in der Beurteilung von biologischem Gewebe im Bereich der stimulierten Ramanmikroskopie und spontanen Raman Spektroskopie, da sie maßgeblich durch Wasser gegeben ist.

Besonders im Bereich der stimulierten Ramanmikroskopie und in CARS-Anwendungen sind die Streckschwingungen der Methyl- und Methylengruppe von großer Bedeutung. Um schnelle Bildgebungsgeschwindigkeiten zu erreichen, werden Gewebetypen mit einer hohen Konzentration von CH_2 - und CH_3 -Molekülen genutzt. Prominente Gewebetypen sind Haut und Hirngewebe. Die Haut besitzt je nach Lokalisation am Körper einen hohen Anteil von subkutanem Fett, das ein hohes Ramansignal hat und schnelle Bildgebung erlaubt [49, 84-86]. Ein häufig mikroskopierter Teil der Haut ist die Talgdrüse, die durch die in ihr produzierten Lipide ein hohes Ramansignal aufweist [86, 87]. Andere Raman Anwendungen an humaner Haut fokussieren die Entwicklung der Keratinozyten [88] die mehrere Entwicklungsstadien durchlaufen bis sie als Korneozyt (Hornzelle) die obere Hautschicht (Stratum corneum) bilden. Eine weitere Anwendung an Haut ist die Differenzierung von Plattenepithelkarzinomen [89].

Neben Haut enthält auch Hirngewebe viele Lipide. Die weiße Hirnsubstanz enthält einen hohen Anteil von Axonen, die für die Signalweiterleitung zwischen den Neuronen zuständig ist. Die Axone sind mit einer Biomembran umhüllt, die durch Myelin gebildet wird und zu 70 % aus Lipiden besteht. Der hohe Lipidgehalt führt zu dem weißlichen Eindruck, der auch zur Bezeichnung weiße Substanz führt. Zellkerne, welche die DNS und eine Vielzahl von weiteren Proteinen wie Chromatin und Histone enthalten, haben einen höheren Anteil von CH_3 -Molekülbindungen mit einem Ramansignal um 2930 cm^{-1} . Die graue Substanz hat einen höheren Anteil von Zellkernen, das umliegende Gewebe ist

jedoch wie im Fall der weißen Substanz lipidhaltiger als der Zellkern, was eine Differenzierung anhand des Ramansignals erlaubt. Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe der beiden spektralen Kanäle eine mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung vergleichbare Kontrastierung des Gewebes gebildet werden kann. Das Ramansignal bei 2840 cm^{-1} ist vergleichbar zur Eosin-Färbung, wobei die Hämatoxylin-Färbung der Zellkerne durch die Subtraktion des Lipid-Signals bei 2840 cm^{-1} vom Protein-Signal bei 2930 cm^{-1} ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$) gebildet wird. Anschließend wird der Schwellwert des Differenzkanals angepasst, sodass nur der Protein-Anteil der CH_3 -Streckschwingung übrig bleibt für die Darstellung der Zellkerne [60]. Weitere Vergleichsstudien haben gezeigt, dass auf Basis von artifiziellen HE-Färbungen mittels SRS-Mikroskopie [19, 21, 43] eine Genauigkeit von über 92 % erreicht werden kann [20].

Neben Hirn- und Hautgewebe werden auch Pathologien anderer Organe und Gewebeklassen in demselben spektralen Fenster untersucht. Darunter Leber [35], Gewebe des Rachenraums [23, 90], Brustgewebe [91], Niere und Lunge [22] sowie DNS [92]. Für alle zuvor genannten Organe und Gewebetypen wird die $\text{CH}_{2,3}$ -Streckschwingung für die Erzeugung des chemischen Kontrasts genutzt. Der Großteil der Veröffentlichungen im Bereich der kohärenten Raman-Bildgebung (SRS, CARS) nutzt dieses spektrale Fenster.

3.4 ZEITCODIERTE RAMANMIKROSKOPIE: TICO-RAMAN

Das Prinzip der zeitcodierten (engl. time encoded, TICO) Aufnahme der Ramanbanden folgt direkt aus der Nature Communication Veröffentlichung aus 2015 [56] und der Dissertationsschrift von Sebastian ‚Nino‘ Karpf. Im Folgenden wird das TICO-Raman Konzept dennoch vollständig eingeführt, da es grundlegend für das Verständnis der Arbeit ist und die Grundlage für das Verständnis der merkmalsgestützten Aufnahme des Ramanspektrums ist.

3.4.1 Prinzip

Die zeitbasierte Abtastung der Ramansignale basiert auf der Synchronisation der verwendeten Laserquellen und ihrer Lasereigenschaften. Für die Abtastung einer Ramanbande mittels SRS müssen zwei Wellenlängen auf der Probe überlagert werden. Soll eine andere Ramanbande oder ein ganzes Ramanspektrum aufgenommen werden, muss eine der Laser-Wellenlängen geändert werden. Im Allgemeinen ist die hochintensive Pumpwellenlänge fest und der Abtastlaser wird in seiner Wellenlänge geändert. Auch als Stokes- oder Probe-Laser bezeichnet, wird für TICO-Raman ein Fourier Domänen Moden gekoppelter (engl. Fourier domain moded locked (FDML)) Laser verwendet. Die periodische Wellenlängenänderung mit einem bekannten Verhältnis zwischen Wellenlänge und Zeit erlaubt es, die Wellenlängenkombinationen aus Pumplaser und FDML-Licht zeitlich zu codieren. Das Abstimmen des FDML-Lasers wird im Englischen als „sweep“ bezeichnet. Die Wellenlängenänderung ist sinusförmig und teilt sich in einen Vorwärts-sweep und einen Rückwärts-sweep auf. Abbildung 3-5 stellt die Änderung der FDML-Wellenlänge λ gegenüber der Zeit t mit zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Pumppulse zum Abtasten der Ramanbanden $\Omega_{1,2}(t)$ dar.

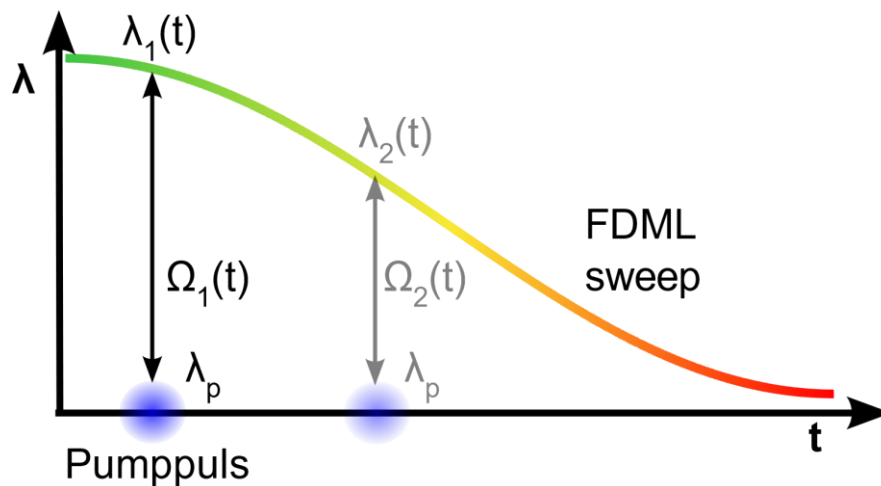


Abbildung 3-5 Prinzip für die Erzeugung des Ramansignals aus Pumplaser und FDML Laser. Die Änderung der Wellenlänge des FDML-Lasers $\lambda(t)$ ist bekannt und wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Pumpimpulsen der Wellenlänge λ_p überlagert. Daraus entstehen unterschiedliche Energiedifferenzen die zu den einzelnen Ramanbanden $\Omega_{1,2}$ führen.

Die Wellenlänge des FDML Lasers für den ersten Zeitpunkt ist durch $\lambda_1(t)$ gegeben. Bei Überlagerung mit dem Pumpimpuls der Wellenlänge λ_p ergibt sich daraus die Energiedifferenz¹³ $\Omega_1(t)$. Ist im Fokus eine Ramanaktive Molekülbindung gleicher Energie, erfährt die Wellenlänge $\lambda_1(t)$ des FDML-Lasers eine Intensitätsänderung, die als SRG gemessen werden kann. Die Energieänderung durch SRG ist als Folge zeitlich im FDML-Licht codiert. Wird der Pumpimpuls zeitlich verschoben und mit einer anderen FDML-Wellenlänge kombiniert, kann eine andere Ramanbande $\Omega_2(t)$ angeregt werden. Für die Abtastung ganzer Spektren wird der Pumpimpuls in jeder neuen Periode des FDML-Lasers äquidistant verschoben, um sukzessive alle möglichen Energiedifferenzen abzutasten. Dieses Konzept ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Die periodische Änderung der Wellenlänge ist als Farbverlauf von grün nach rot dargestellt. Als Zeitbasis dient die periodische Wellenlängenänderung des FDML-Lasers. Die Pumpimpulse sind synchronisiert zur Zeitbasis des FDML-Lasers. Die Detektion inklusive der Digitalisierung sind ebenfalls synchronisiert gegenüber den Laserquellen, was ein direktes Abtasten der Raman-Information erlaubt und zum zeitcodierten TICO-Spektrum führt.

¹³ Berechnung der Energiedifferenz der Ramanbande mit $\Omega(t) = \frac{hc}{\lambda_p} - \frac{hc}{\lambda(t)}$

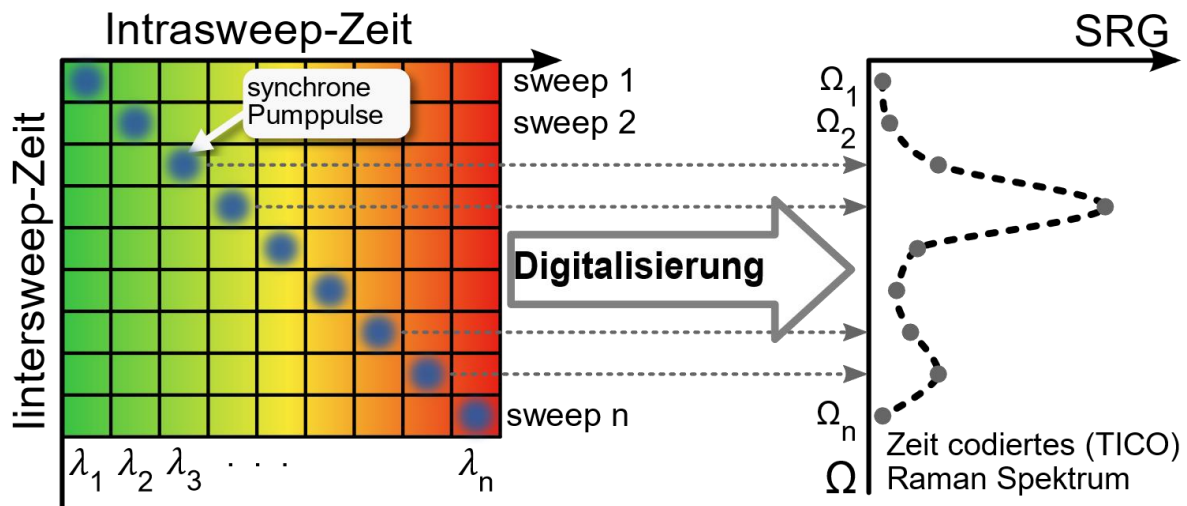


Abbildung 3-6 TICO Raman Konzept: Farbverlauf von grün nach rot symbolisiert die Wellenlängenänderung des FDML-Lasers, wobei ein Abstimmen der Wellenlänge als „sweep“ bezeichnet wird. Die Verzögerung der Pumppulse (blau) wird gegenüber dem Start jedes neuen FDML-Sweeps sukzessive erhöht, was zum Abfragen einer anderen Ramanbande führt. Durch die Synchronisation der Laserquellen mit der Digitalisierungseinheit und der bekannten zeitlichen Änderung der FDML-Wellenlänge ist die stimulierte Raman Verstärkung (engl. Stimuated Raman gain, SRG) in der Zeit codiert, was zum Begriff TICO (engl. time encoded) führt.

4 EXPERIMENTELLER AUFBAU

4.1 SPONTANES RAMANMIKROSPEKTROMETER

Für den Vergleich der TICO-Raman Ergebnisse wurde ein kommerzielles Ramanmikrospektrometer der Firma Horiba genutzt. Das Horiba Xplora Plus, gezeigt in Abbildung 4-1, ist ein vollautomatisches, spontanes Ramansystem. Es sind zwei Anregungswellenlängen (532 nm, 785 nm) vorhanden. Die Intensität der Anregungslaser kann stufenweise angepasst werden. Der grüne Anregungslaser (Cobolt 08-DPL) hat eine maximale Ausgangsleistung von 100mW. Nach dem Objektiv stehen maximal 54 mW optische Leistung zur Verfügung. Für den 785 nm Laser der Firma IPS stehen ebenso 100 mW zur Verfügung, wovon maximal 36mW nach dem Objektiv zur Verfügung stehen. Eine höhere Transmission kann laut Hersteller durch geeignetere Objektive erreicht werden.

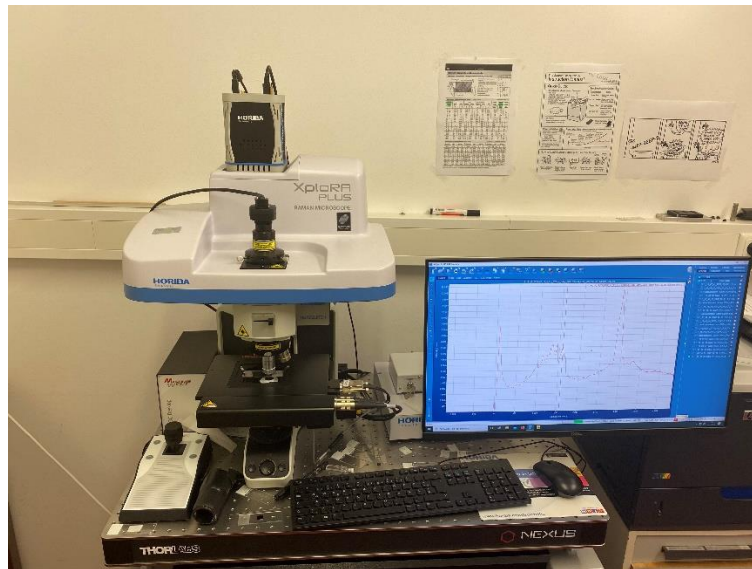


Abbildung 4-1 Verwendetes Ramanmikrospektrometer: Horiba XPlora Plus für die Aufnahme von spontanen Ramanspektren, für den Vergleich mit den TICO-Raman Ergebnissen. Voll automatisches Ramansystem mit zwei Anregungswellenlängen - 532 nm und 785 nm sowie 4 optischen Gittern (600 l/mm, 1200l/mm, 1800 l/mm und 2400 l/mm). Die vorderseitenbeleuchtete EM-CCD ist für den sichtbaren Teil des Lichtspektrums optimiert.

Das Gitterspektrometer mit einer Fokallänge von 200 mm hat 4 optische Gitter zur Auswahl. Die Reflexionsgitter haben 600, 1200, 1800 und 2400 Linien/mm (l/mm). Die maximale spektrale Auflösung beträgt $1,4 \text{ cm}^{-1}$, abhängig vom verwendeten Anregungslaser und des verwendeten Gitters. Die minimale spektrale Auflösung ist mit 8 cm^{-1} angegeben. Die Schemazeichnung in Abbildung 4-2 zeigt eine Aufsicht des XPlora Plus Mikrospektrometer, mit drei unterschiedlichen Strahlengängen. Der blaue Strahlengang stellt das Laserlicht für die Anregung dar. Nach Anpassung der Leistung durch Abschwächungsfilter wird das Anregungslicht linear polarisiert, über Spiegel auf das Objektiv geleitet und auf die Probe fokussiert. Der graue Strahlengang stellt die Beleuchtung der Probe über eine Weißlicht-LED dar. Die interne Kamera im Strahlengang erlaubt eine gleichzeitige Beobachtung der

Probe und des Laserfokus. Dies erlaubt eine Anpassung des Laserfokus auf der Probe und hat sich in der Praxis als wichtiges Ausstattungsmerkmal erwiesen. Neben der internen Kamera ist eine externe Kamera mit 5 Megapixel vorhanden, die sich über die Software auswählen lässt und für die digitale Mikroskopie der Probe vorgesehen ist. Der rote Strahlengang stellt das Ramanlicht dar. Entsprechend der Anregungswellenlänge wird der passende Ramanfilter im Strahlengang positioniert, um die Rayleigh-Linie zu unterdrücken. Umgelenkt von einem Spiegel wird das Licht durch eine Linse in die Ebene des konfokalen Lochs abgebildet. Zusätzlich kann die Polarisation des Lichts angepasst werden. Dies ermöglicht zusätzliche Informationen über den Zustand von Molekülbindungen und deren Anordnung in Materialien wie Kristallen, Polymeren und Flüssigkristallen zu gewinnen. Die konfokale Blende erlaubt, das effektive Messvolumen anzupassen. Eine hohe Konfokalität schließt viele Raumwinkel aus und verkleinert die Schichtdicke, aus der das Licht das konfokale Loch passieren kann. Die Lochgröße kann zwischen 50, 100, 200 und 300 μm variiert werden. Diese Funktion erlaubt es, ungewünschte Fluoreszenz zu unterdrücken. Hauptsächlich ist hier die Fluoreszenz der Probe oder die Fluoreszenz des Objektträgers zu nennen. Die Experimente am Gerät haben gezeigt, dass der Einfluss des konfokalen Lochs einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Qualität der Spektren hat, was für eine gute Grund-Konfokalität des Strahlengangs spricht. Der Eingangsschlitz des Spektrometers lässt sich zwischen 50, 100 und 200 μm einstellen.

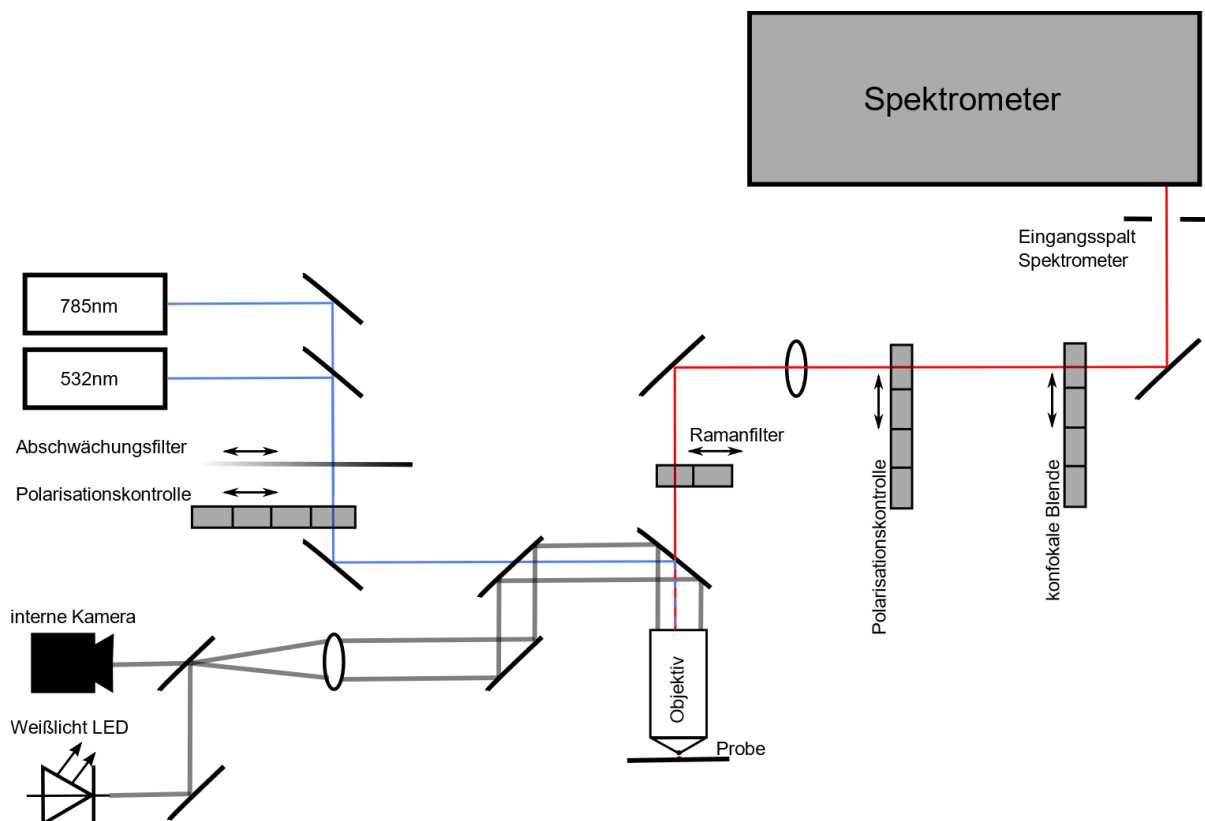


Abbildung 4-2 Schemazeichnung des optischen Strahlengangs des Horiba XPlora Plus. Der blaue Pfad repräsentiert den Strahlengang des Laserlichts. Eine Weißlicht-LED und die interne Kamera erlauben die gleichzeitige Beobachtung der Probe und des Lasers für die Feinjustierung der Fokusebene (grauer Strahlengang). Der rote Strahlengang stellt den Strahlengang des Raman gestreuten Lichts dar.

Neben der Qualität des optischen Strahlengangs ist die Detektionseinheit des Spektrometers ein kritisches Bauteil des Ramanmikroskops. Üblicherweise werden CCD (engl. charged couple device) Kameras benutzt. Für den Einsatz in der Spektroskopie werden zweidimensionale Kameras eingesetzt, wobei die Detektorfläche rechteckig ist und das Spektrum auf die lange Seite des Detektors abgebildet wird. Für die Detektion der kleinen Ramansignale wird eine hohe Sensitivität der CCD-Kamera benötigt, die durch eine Kühlung der Kamera erreicht wird. In der Regel wird thermoelektrisch, über ein Peltier-Element, auf -75°C gekühlt. Die Kühlung reduziert das Gesamtrauschen der Kamera, das sich aus unterschiedlichen Rauschquellen zusammensetzt. Für gekühlte CCD-Kameras stellt das Schrotrauschen die größte Rauschquelle dar und kann nicht eliminiert werden. Das Dunkelrauschen oder auch thermische Rauschen kann durch die Kühlung effektiv reduziert werden. Hinzu kommt das Ausleserauschen des Verstärkers, das von der Ausleserate und der Verwendung des EM-Modus abhängt. EM steht für „Electron Multiplying“, was mit Elektronen-Multiplizierung übersetzt werden kann. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die wellenlängenabhängige Quanteneffizienz (QE) des Detektors. Abbildung 4-3 zeigt die QE verschiedener CDD-Kameras, die als Ausstattungsoptionen für das XPlora Plus zur Verfügung stehen. CCD-Kameras für die Ramanspektroskopie bestehen in der Regel aus Silizium. Lediglich für Ramananwendungen im nahen Infrarot werden Detektoren aus Gallium-Arsenid verwendet. Die Bandlücke von Silizium beträgt 1,17 eV, was einer Wellenlänge von 1060 nm entspricht.¹⁴ Für längere Wellenlängen kann Silizium als transparent betrachtet werden.¹⁵ Die QE der verbauten CCD-Kamera (Synapse EM OSD-SY-03) ist durch den blauen Graphen in Abbildung 4-3 gekennzeichnet. Unterschieden werden die Kameras durch ihre Optimierung für den ultravioletten (UV) oder sichtbaren (VS) Bereich des Spektrums. Die Quanteneffizienz kann erhöht werden, wenn der Chip gedünnt und von hinten beleuchtet wird (engl. back illuminated, BI), im Vergleich zur Beleuchtung von vorne (engl. front illuminated, FI). Die Photonen müssen nicht die Steuerelektroden der CCD durchdringen, was zu der höheren Quanteneffizienz führt. Durch die Steuerelektroden wird im Fall von FI-CCDs ein Teil des lichtempfindlichen Siliziums verdeckt. Für BI-CCDs sind einige Nachteile zu nennen. Oft wird eine Stickstoffkühlung benötigt, um das Dunkelrauschen effektiv zu reduzieren. Das gedünnte Siliziumsubstrat stellt für Wellenlängen größer 650 nm ein Etalon dar, was zu Interferenzeffekten im Spektrum führt. Darüber hinaus sind die höheren Anschaffungskosten für BI-CCDs zu nennen. Die Quanteneffizienz im UV-Bereich kann durch eine fluoreszierende Lackierung erreicht werden.

¹⁴ Bandlücke angeben für 0K (<https://de.wikipedia.org/wiki/Bandlücke>).

¹⁵ Für eine höhere Quanteneffizienz bis 1100 nm kann ein dickerer Siliziumträger verwendet werden, um die Absorptionswahrscheinlichkeit der Photonen zu erhöhen. Diese Kameras werden als „deep depletion“ CCD bezeichnet.

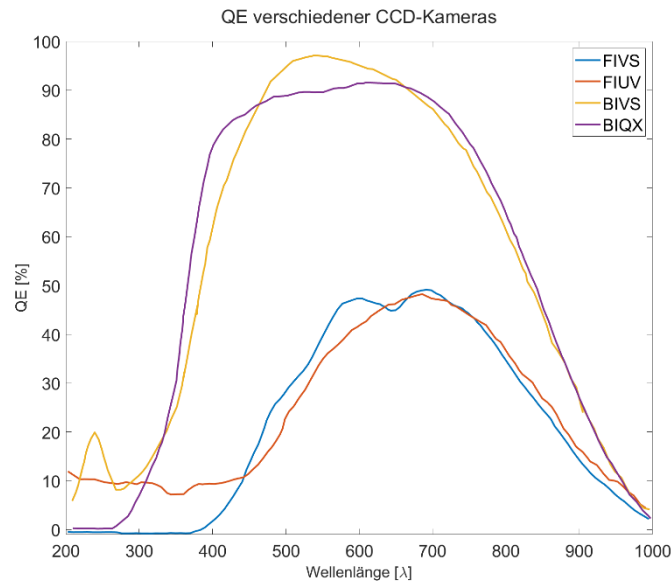


Abbildung 4-3 Quanteneffizienz (QE) gegenüber der Wellenlänge für unterschiedliche CCD-Kameras. BI (back illuminated): rückseitenbeleuchtet, VS (visible) sichtbar: Kamera optimiert für sichtbaren Anteil des Spektrums. FI (front illuminated): vorderseitenbeleuchtet, UV: ultraviolett, QX: Marketingabkürzung von Horiba – bessere QE im UV-Bereich. Verwendetes XPlora Plus nutzt FIVS CCD-Kamera (blauer Graph). Abbildung nachgezeichnet aus dem Datenblatt der verwendeten Synapse EM OSD-SY-03.

Für eine Ramananregung mit 532 nm erstreckt sich das Ramanspektrum bis 675 nm, was einer Wellenzahl von 4000 cm^{-1} entspricht und im Bereich der maximalen QE der verwendeten FIVS-CCD liegt. Eine Anregung mit 785 nm führt zu einer Wellenlänge von 1114 nm für die Wellenzahl von 4000 cm^{-1} . Dies liegt außerhalb der QE von Silizium, erlaubt aber eine Messung bis 3100 cm^{-1} , was einer Wellenlänge von 1037 nm entspricht. Die kleinen Ramansignale im Fingerprint-Bereich bis 1800 cm^{-1} erstrecken sich bis 914 nm, was zu einer QE von $\sim 25 \%$ am Detektor führt. Die Kombination aus kleinerer QE für die Anregung mit 785 nm und der Abhängigkeit der Ramanintensität mit der vierten Potenz der Anregungswellenlänge führt zu einem stärkeren Signal bei der Anregung mit 532 nm. Dem gegenüber steht die höhere Fluoreszenz bei der Anregung mit 532 nm. Üblicherweise wird wegen der hohen Fluoreszenz eine Anregung bei $\sim 785 \text{ nm}$ empfohlen.

Die optische Auflösung des Systems ist laut Hersteller lateral kleiner 500 nm und axial kleiner 2 μm . Die Auflösung ist für die 100x Vergrößerung eines planachromatischen Olympus-Objektivs angegeben. Außerdem sind planchromatische Olympus Objektivs, mit 5x und 10x Vergrößerung vorhanden. Für die Navigation ist ein motorisierter xyz-Linearschlitten mit einem Encoder verbaut, der in x-Richtung 75 mm und in y-Richtung 50 mm abdeckt. Die minimale Schrittgröße beträgt 10 nm, mit einer lateralen sowie axialen Reproduzierbarkeit von $\pm 1 \mu\text{m}$. Der softwarekontrollierte Linearschlitten ist mit der Ausleserate der CCD synchronisiert und erlaubt ein kontinuierliches Auslesen der Spektren bei gleichzeitigem Versatz der Probe. Totzeiten durch die mechanische Blende der CCD-Kamera sowie Anfahrzeiten zu einzelnen Messpunkten entfallen und verkürzen die Aufnahmezeit. Diese als SWIFT bezeichnete Funktion ist besonders bei der Messung von Proben mit starkem Ramansignalen interessant.

4.2 LASERLICHTQUELLEN DES TICO-RAMANSYSTEMS

Die verwendeten Laserquellen sind in der Arbeitsgruppe von Professor Huber entwickelte und gebaute Faser-Laser. Der Pump Laser und die zwei verwendeten FDML-Laser sind vollständig faserbasiert aufgebaut. Die elektronische Ansteuerung der Laserquellen ermöglicht einen variablen Betrieb für unterschiedliche Aufnahme Konzepte. Die faserbasierten Laser ermöglichen zukünftig den Einsatz von Endoskopen und die Translation in Operationsmikroskope. Der geringe Formfaktor sowie die Robustheit begünstigt den flexiblen Einsatz eines Faserlasers in mehreren Experimenten mit minimalem zeitlichem Aufwand für die Inbetriebnahme.¹⁶ Die verwendeten Faserkomponenten sind kosteneffektiv und erlauben den Einsatz außerhalb idealer Laborbedingungen.

4.2.1 Pumpquelle

Als Pumpquelle wurde ein Faserlaser als Master-Oszillator-Leistungsverstärker (engl. master oscillator fiber amplifier, MOPA) aufgebaut und verwendet. Der Laser basiert auf der Verstärkung des Masteroszillators, welcher selbst eine Laserquelle ist. Bei der Verwendung von Laserdioden als Masteroszillator lassen sich unterschiedliche Pulslängen und Repetitionsraten durch eine aktive elektronische Modulation der Laserdiode umsetzen. Die kurzen Laserpulse werden durch die Kombination einer vormodulierten Laserdiode und eines elektro optischen Modulators (EOM) erzeugt. Dieser erste Schritt wird als Seedpulserzeugung bezeichnet. Die Seedpulse werden anschließend in einem dreistufigen Prozess bis zu Spitzenleistungen im Kilowattbereich verstärkt. Die ersten beiden Verstärkerstufen sind kerngepumpte Ytterbium dotierte Faserverstärker (YDFV), wohingegen die letzte Stufe als Doppelmantel (engl. double cladding, DC) YDFV aufgebaut ist. Die Doppelmantelstruktur erlaubt höhere Pumpleistungen, im Vergleich zu kerngepumpten Faserverstärkern. Der gesamte Laser ist mit polarisationserhaltenden (eng. polarisation maintaining, PM) Faserkomponenten aufgebaut. Die Polarisation des Lichts ist daher linear, fest definiert und erlaubt eine Anpassung der Polarisation an die Polarisation des FDML-Lichtes für die Erzeugung der stimulierten Ramanstreuung. Faserlaser im MOPA-Design sind robust, kompakt und kosteneffizient zu bauen und werden in vielen Industriezweigen wie der Materialbearbeitung und Telekommunikation eingesetzt.

¹⁶ In der AG-Huber entwickelte Faserlaser wurden ohne besondere Transportbedingungen erfolgreich in Jena, Göttingen und Rotterdam eingesetzt.

4.2.1.1 Seed-Pulse-Erzeugung

Der Laser basiert auf der Verstärkung von Laser-Pulsen, mit einer Wellenlänge von 1064 nm. Die Laserdiode ist eine „distributed feedback diode“ DFB-Diode (Eagleyard EYP-DFB-1064-00500). Die spektrale Linienbreite der verwendeten DFB-Diode beträgt 2 MHz.¹⁷ Durch die schmale Linienbreite werden DFB-Dioden vermehrt in der faseroptischen Telekommunikation eingesetzt.¹⁸ Das Gesamtsetup für die Erzeugung der kurzen Pulse ist in Abbildung 4-4 dargestellt. Die DFB-Diode wird mit einem Laserdiodencontroller (LDC) (Wieserlabs WL-LDC10D) betrieben und mit einem Wellenzuggenerator (engl. arbitrary waveform generator (AWG)) vormoduliert. Die Laserdiode emittiert 40 ns lange Pulse, mit einer optischen Leistung von 25 mW. Der Strom für die Vormodulation beträgt 190 mA und ist an die Spezifikationen für den Dauerstrichbereich (engl. continuous wave, CW) angelehnt. Zum Modulieren der kurzen Pulse wird ein elektro optischer Modulator (EOM) (Photline NIR-MX-LN-10), mit einer Bandbreite von 12 GHz verwendet. Das Triggersignal des AWGs (vgl. Abbildung 4-4) hat eine feste voreingestellte Verzögerung, gegenüber dem elektrischen Signal für die Vormodulation der Laserdiode. Somit ist gewährleistet, dass sich elektrischer und optischer Puls zeitlich am EOM überlagern. Mithilfe eines Pulsgenerators (PG) kann die Pulslänge zwischen 500 ps und 10 ns eingestellt werden.¹⁹ Die Ausgangsleistung des PG reicht nicht aus, um die volle Modulationstiefe des EOM zu erreichen, sodass ein zusätzlicher Verstärker (Photline DR-PL-10-MO) verwendet wird. Zum Schutz der Komponenten wird nach dem EOM sowie zwischen EOM und Laserdiode ein Isolator verbaut. Aufgrund der geringen Leistung und um eine möglichst große Flexibilität zu erhalten, sind alle Komponenten mit Fasersteckern verbunden und nicht gespleißt.

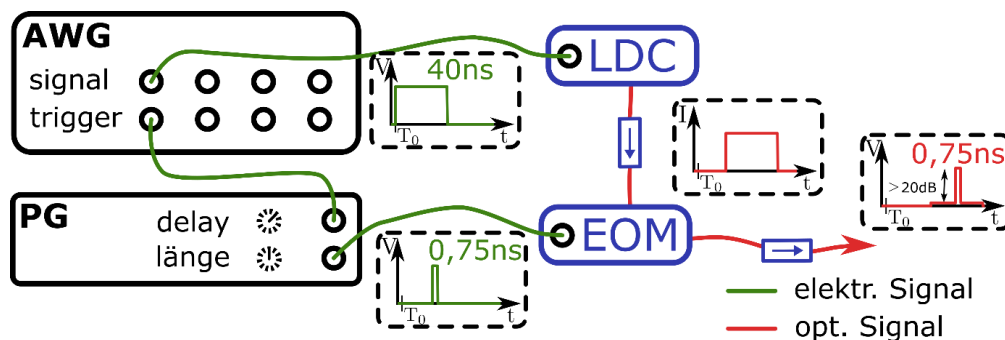


Abbildung 4-4 Schematischer Aufbau des Masterszillators. Ein arbiträrer Wellenzug Generator (AWG) erzeugt das Signal der Vormodulation für den Laserdioden Controller (LDC) und den Pulsgenerator (PG). Der Elektro optische Modulator (EOM) moduliert aus der 40 ns langen Vormodulation 750 ps kurze Pulse, die für die kaskadierende Verstärkung genutzt werden.

¹⁷ Zuvor wurde eine „close to chip“ Lumics LU1064M200 verwendet mit einer spektralen breite von 0.4 nm. Dies entspricht ~100 GHz bei 1064 nm.

¹⁸ 1550 nm-Band mit Erbium-Verstärkern für große Distanzen. 1300 nm-Band für kürzere Strecken.

¹⁹ Im aktuellen Aufbau ist die Pulslänge durch die Elektronik begrenzt. Mit demselben Konzept konnten innerhalb der AG-Hubert bereits Pulslängen mit 30 ps erzeugt werden.

Der EOM erreicht eine Unterdrückung von 23 dB, sodass ein geringer Teil des unterdrückten Lichts das EOM passiert und weiter hochverstärkt wird (vgl. Abbildung 4-5 links). Durch die Vormodulation wird dieser Anteil auf die Zeit der Vormodulation begrenzt, im Vergleich zum Dauerstrichbetrieb der Diode. Der Anteil des Lichts, der durch den EOM nicht unterdrückt wird, reduziert die Verstärkung der Laserpulse. Entscheidend für die Effizienz der Verstärkung ist die EOM-Unterdrückung gegenüber dem Verhältnis aus Pulslänge und Vormodulation: Die Vormodulation beträgt 40 ns, aus der Laserpulse mit einer Länge von 750 ps herausmoduliert werden. Der herausmodulierte Laserpuls entspricht somit $\frac{1}{53}$ der Vormodulation. Durch die EOM-Unterdrückung von 23 dB wird $\sim \frac{1}{200}$ der Vormodulation vom EOM transmittiert. Solange der vom EOM transmittierte Anteil ($\frac{1}{200}$) kleiner als das Verhältnis aus Pulslänge und Vormodulation ($\frac{1}{53}$) ist, ist der vom EOM transmittierte Anteil nicht dominant gegenüber den Laserpulsen für die Verstärkung.

Für die zeitaufgelöste Messung der Laserpulse werden die Seed-Pulse mit einer Photodiode (Discovery Semiconductors DSC20H, 30 GHz Analogbandbreite) und einem Oszilloskop (LeCroy WaveMaster 820Zi-B, 20 GHz Analogbandbreite) aufgenommen (vgl. Abbildung 4-5). Das Signal wird am Oszilloskop mit $\frac{10,89 \text{ mV}}{\text{mW}}$ dargestellt, was zu einer optischen Leistung von 5 mW für die Seedpulse führt.

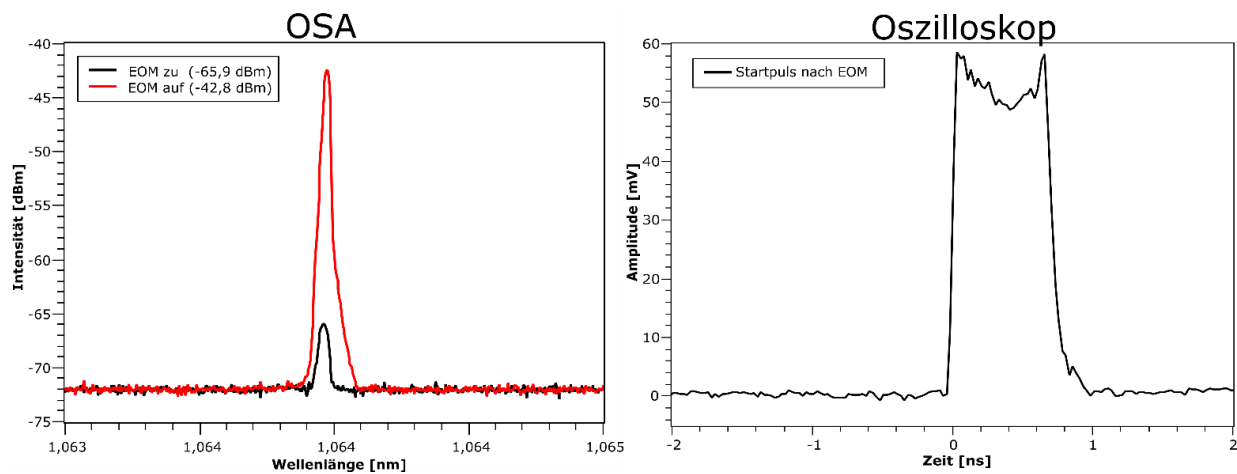


Abbildung 4-5 Links: Unterdrückung des EOMs gemessen mit einem optischen Spektrum Analysator (OSA). Der EOM unterdrückt den Laserpuls um 23 dB. Die spektrale Breite der Laserdiode liegt unter der Auflösungsgrenze des OSAs (20 pm). Rechts: Zeitlich aufgelöster Startpuls nach dem EOM, mit einer optischen Leistung von $\sim 5 \text{ mW}$ ($10,89 \text{ mV/mW}$) und einer Länge von 750 ps.

4.2.1.2 Ytterbium dotierte Faserverstärker

Die Laserpulse des Masteroszillators werden in zwei kerngepumpten Faserverstärkern verstärkt. Beide Verstärkerstufen sind identisch aufgebaut. Als aktives Medium wird eine Ytterbium-dotierte Faser (Nufern PM-YSF-LO-HP) verwendet. Jede Stufe enthält $\sim 1,8 \text{ m}$ aktive Faser und wird in rückwärtiger Richtung optisch, im Absorptionsmaximum von Ytterbium bei 976 nm, gepumpt. Die Ytterbium-

dotierte Faser wird durch eine frequenzstabilisierte Single-Mode Laserdiode mit einer optischen Leistung von 450 mW gepumpt. Durch die geringe Reabsorption von Ytterbium bei 1064 nm entsteht ein Quasi-Vier-Niveau Laser, was einen effizienten Laserbetrieb ermöglicht [93]. Vereinigung der Pump- und Signalwellenlänge wird durch einen Wellenlängen-Multiplexer (engl. wavelength division multiplexer, WDM) umgesetzt. Neben der Verstärkung des Signallichts durch stimulierte Emission, relaxiert ein Teil der Ytterbium-Atome (Yb^{3+}) spontan und wird im Laser weiter verstärkt. Dieser im Englischen als „amplified spontaneous emission“ (ASE) bezeichnete Anteil des Laserlichts reduziert die gewünschte Verstärkung der Signalwellenlänge und wird durch einen Laserlinienfilter (LLF) gefiltert. Lediglich der ASE-Anteil im Transmissionsfenster des LLF wird in den folgenden Stufen weiter verstärkt. Der schematische Aufbau des gesamten Lasers ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Der grau hinterlegte Kasten kennzeichnet die verwendeten Komponenten. Die roten Zahlen geben Aufschluss über die Verluste der einzelnen Stufen.

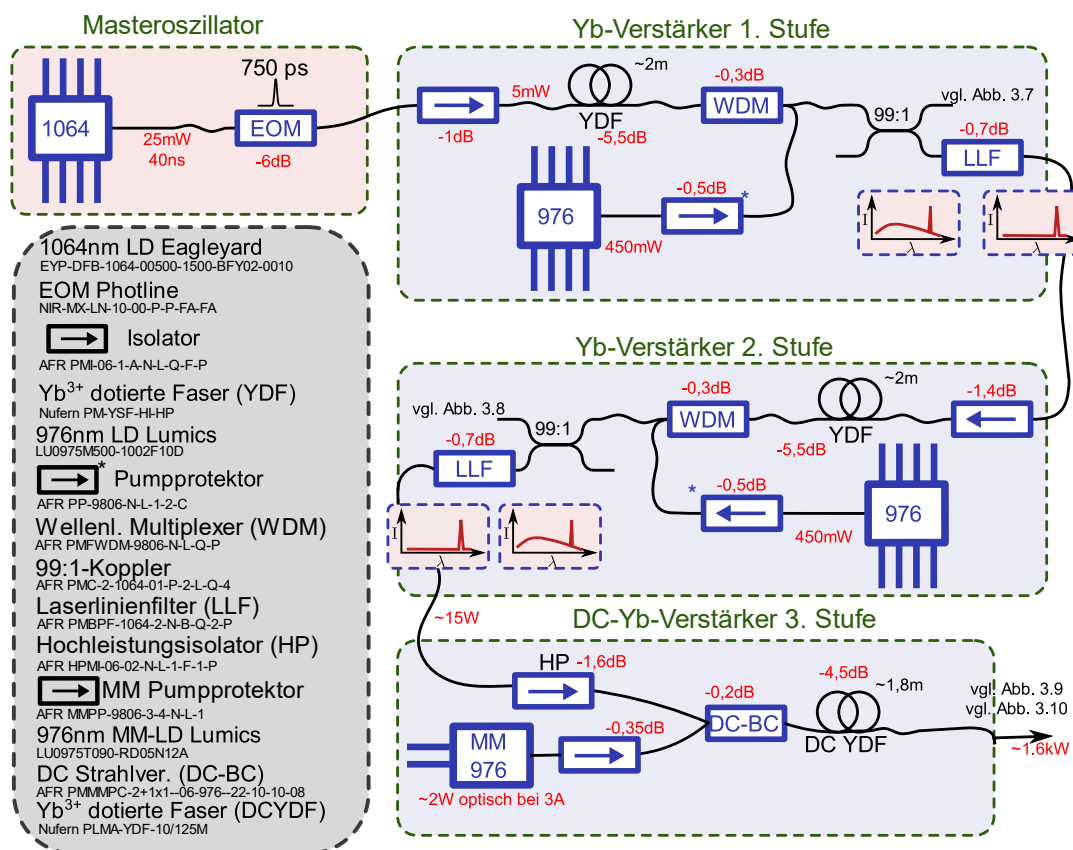


Abbildung 4-6 Zeichnung des Pumplasers. Der rote Kasten stellt den Masteroszillator dar. Eine vormodulierte DFB-Diode (1064 nm) und ein Elektro optischer Modulator (EOM) führen zu 750 ps langen Laserpulsen, die in zwei identisch aufgebauten kerngepumpten Ytterbium-Faserverstärkern vorverstärkt werden. Beide Stufen werden mit 450 mW optisch, in rückwärtiger Richtung gepumpt. Das Pumplicht wird über einen Wellenlängen-Multiplexer (WDM) in die 1,8 m lange Ytterbium dotierte Faser (YDF) eingekoppelt. Diagnoseports (99/1-Faserkoppler) koppeln 1% des Lichts zur Überwachung des Lasers aus. Die dritte Stufe ist als Doppelmantel (DC) Leistungsverstärker umgesetzt. Die 1,8 m aktive Doppelmantel-Faser (DC YDF) wird in Vorwärtsrichtung gepumpt. Die Multimodediode liefert bis zu 9W optische Leistung und ermöglicht eine Verstärkung bis zu 2,45 kW Spitzenleistung, der initial 5 mW starken Laserpulse des Masteroszillators. Der graue Kasten kennzeichnet die verwendeten Komponenten.

Nach der zweiten Stufe, im Übergang zum Hochleistungsverstärker (Abschnitt 4.2.1.3), ist ein Hochleistungsisolator (HP) verbaut, um den Laser durch verstärkte Rückreflexe zu schützen. Der Einbau am Übergang zum Hochleistungsverstärker ist dem Einbau am Laserausgang vorzuziehen, da einerseits die Belastung des Isolators höher ist und andererseits die zusätzliche Faser zu nichtlinearen Effekten in der Faser führen kann. Der Aufbau der DC-Stufe wird im Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben.

Am Ende der ersten und zweiten Verstärkerstufe sind Faserkoppler eingebaut, die 1% der optischen Leistung auskoppeln. Die Faserkoppler der ersten zwei Stufen sind vor den Laserlinienfilter verbaut, sodass der Faserkoppler der ersten Stufe das gesamte ASE-Spektrum des YDFV auskoppelt. Für die Beurteilung der ersten Verstärkerstufe wird das Laserlicht am 1%-Ausgang der ersten Stufe mit unterschiedlichen spektralen Auflösungen aufgenommen. In Abbildung 4-7 ist die Signalwellenlänge bei ~1064 nm im Fenster von 1062-1066 nm dargestellt. Die gewählte spektrale Auflösung ist um das jeweils 10-fache zwischen den einzelnen spektralen Auflösungen abgestuft. Das Laserlicht wird im OSA zwischen der niedrigsten spektralen Auflösung (2 nm) über einen 100-fach größeren Bereich integriert als für die höchste spektrale Auflösung von 20 pm. Auffällig ist, dass für die Signalwellenlänge bei 1064 nm dieselbe Intensität von -18 dBm am OSA für alle drei spektralen Auflösungen vorliegt. Außerhalb des Integrationsfensters der Signalwellenlänge nimmt bei Verringerung der spektralen Auflösung der ASE-Anteil zu. Im Idealfall bleibt das Verhältnis aus Abnahme der spektralen Auflösung und Erhöhung des ASE erhalten. Zwischen 20 pm und 0,2 nm nimmt die Auflösung um das zehnfache ab und der ASE Untergrund steigt um ~9 dB, was eine achtfache Erhöhung bedeutet. Ein nahezu identisches Verhältnis ist zwischen 0,2 nm und 2 nm spektraler Auflösung gegeben. Hieraus kann gefolgert werden, dass der ASE-Anteil bei der Zentralwellenlänge lediglich durch nicht unterdrücktes Licht der Vormodulation gegeben ist.

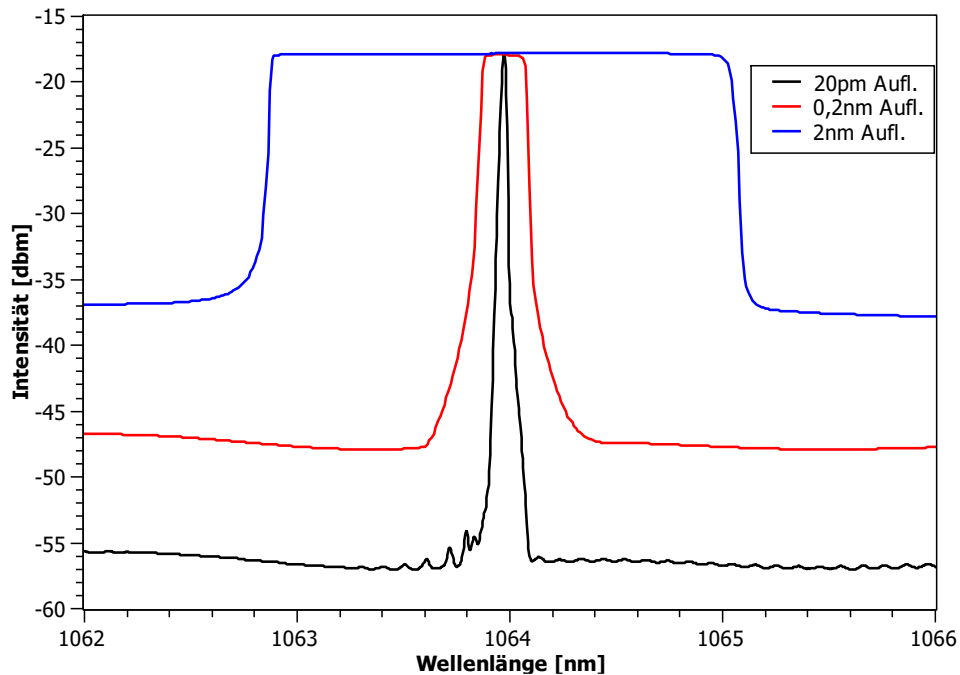


Abbildung 4-7 Spektrum für das Signallicht bei 1064 nm für die erste Ytterbium-Stufe aufgenommen mit unterschiedlichen spektralen Auflösungen am OSA. Die gleiche Intensität des Signallichts für unterschiedliche Auflösungen bestätigt das die Leistung bei der Signalwellenlänge von 1064 nm gegeben ist und nicht durch zusätzliche verstärkte spontane Emission gegeben ist.

Die zuvor getroffene Aussage gilt jedoch nur in dem betrachteten spektralen Fenster. Das ASE verteilt sich über einen großen Wellenlängenbereich mit maximaler Intensität um 1030 nm. Dargestellt in Abbildung 4-8 ist das Laserspektrum der ersten Verstärkerstufe vor dem LLF im spektralen Bereich von 1000-1100 nm. Hier ist die vom OSA integrierte Leistung gegenüber der Wellenlänge linear aufgetragen und nicht logarithmisch. Die Modulationen innerhalb des breiten ASE-Bereichs um 1030 nm ist auf die unterschiedlichen Modenfelddurchmesser der verwendeten Fasern zurückzuführen.²⁰ Für die Angabe des gesamten ASE-Anteils wird über den breiten ASE-Bereich zwischen 1010-1050 nm integriert und mit dem Integral über die Signalwellenlänge verglichen, was zu einem 76-fach höheren Anteil der ASE gegenüber der Signalwellenlänge bei 1064 nm führt.²¹ Der ASE-Anteil ist im Wesentlichen außerhalb der Transmissionswellenlänge des LLF gegeben und kann somit effektiv gefiltert werden. Das Transmissionsfenster der LLF ist 3 nm breit.

²⁰ Faser des 1%-Ausgangs ist PM-980, wohingegen die Faser zum OSA SMF28-e ist.

²¹ Die Messung des ASE-Anteils aus Abbildung 4-8 wurde ca. 6 Monate später aufgenommen. In diesem Zeitraum hat sich Performance der ersten Stufe verschlechtert. Die Messung wurde dennoch diskutiert, da sie eindrücklich zeigt, in welchem Maße ASE in der ersten Stufe eine Rolle spielt und die Verstärkung und Effizienz des Lasers verschlechtert.

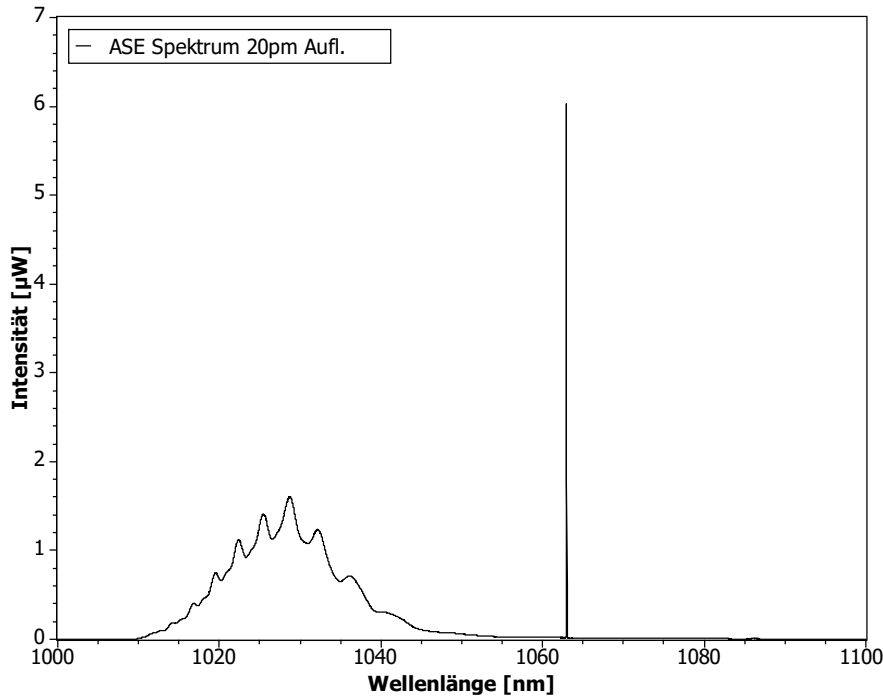


Abbildung 4-8 Linear aufgetragenes Spektrum des Pumpasers nach der ersten Verstärkerstufe vor dem Laserlinienfilter (LLF). Breiter ASE-Bereich um das Verstärkungsmaximum bei ~ 1030 nm der Ytterbium-Atome. Die Modulationen des Spektrums sind durch unterschiedliche Fasertypen des Lasers und der Übertragungsfaser zum OSA gegeben. Durch Integration über die Signalwellenlänge bei 1064 nm im Vergleich zum breiten ASE-Bereich von 1010-1050 nm ergibt sich eine 76-fache höhere Leistung in der ASE. Der ASE-Anteil ist im Wesentlichen nicht bei 1064 nm gegeben und kann effektiv durch den LLF unterdrückt werden.

Dieselbe Aufnahme zur Beurteilung der ASE wurde für die zweite Verstärkerstufe durchgeführt und ist in Abbildung 4-9 dargestellt. Das 3 nm breite Fenster des ASE-Filters ist klar zu erkennen. Außerhalb des spektralen Fensters (1062,5 nm) bleibt das Verhältnis aus achtfacher Erhöhung der ASE bei zehnfacher Abnahme der spektralen Auflösung erhalten. Innerhalb des spektralen Fensters des Laserpulses ist zu sehen, dass die Leistung mit Abnahme der spektralen Auflösung um ~ 1 dB steigt. Dieser Anstieg ist auf zusätzliches ASE im Integrationsfenster der zugehörigen spektralen Auflösung zurückzuführen. Vergleicht man den Untergrund innerhalb des Transmissionsfensters des LLF mit der maximalen Intensität der Signalwellenlänge, ergibt sich ein Unterschied von ~ 38 dB in beiden Verstärkerstufen (Vgl. Abbildung 4-9, Abbildung 4-8). Folglich bleibt das Verhältnis aus ASE und Signallicht erhalten. Nach der zweiten Verstärkerstufe haben die Laserpulse eine Leistung von 14,7 W.

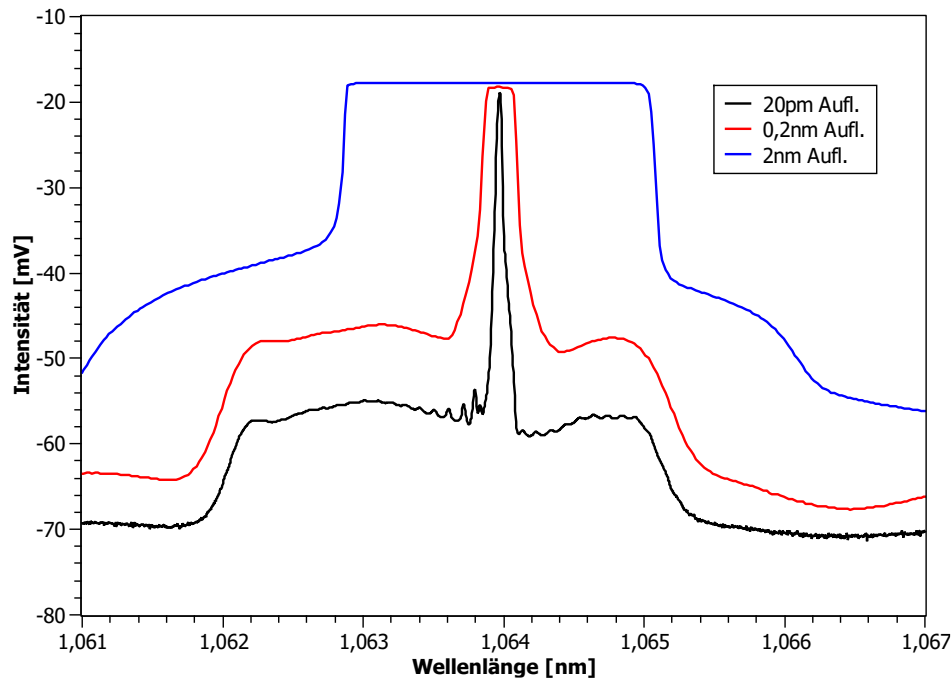


Abbildung 4-9 OSA-Spektrum für das Signallicht bei 1064 nm für die zweite Ytterbium-Stufe aufgenommen mit unterschiedlichen spektralen Auflösungen. Das 3 nm breite Transmissionsfenster des Laserlinienfilters ist von 1062-1065 nm erkennbar. Für die Signalwellenlänge bei 1064 nm nimmt die Leistung durch zusätzliches ASE nur geringfügig zu (~ 1 dB) durch die Reduzierung der spektralen Auflösung. Nach der zweiten Stufe haben die Pulse eine Spitzenleistung von 14,7 W.

4.2.1.3 Doppelmantel Ytterbium dotierter Faserverstärker

Nach den ersten zwei kerngepumpten YDFV haben die Laserpulse eine Leistung von 14,7 W. Die Spitzenleistung der Pulse ist so hoch, dass eine effiziente Verstärkung in einer kerngepumpten Verstärkerstufe nicht mehr gewährleistet werden kann. Das Einkoppeln hoher Pumpleistungen in den Faserkern kann zu einer Zerstörung der Faser führen. Zudem gibt es keine Singlemoden-Pumpdioden mit optischen Leistungen größer 1 W²², die benötigt werden, um einerseits effizient in den Singlemodenkern der aktiven Faser einzukoppeln und andererseits die benötigte Pumpleistung für die Verstärkung bereitzustellen. Als Alternative werden Doppelmantelfasern verwendet, wobei das Pumplicht im ersten Mantel der Faser propagiert. Das Pumplicht wird durch Multimoden-Dioden bereitgestellt, die optische Leistungen von bis zu 10 W haben. Das Pumplicht wird über einen Strahlenkombinierer in Vorwärtsrichtung eingekoppelt. Die aktive Faser hat eine Länge von $\sim 1,8$ m. Der größere Faserkern mit einem Durchmesser von $11 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$ reduziert den Einfluss von nichtlinearen Effekten. Nach der aktiven Faser ist ein 40 cm langes Stück passive Faser gleichen Aufbaus (PLMA-GDF-10/125-M) eingespleißt. Am Ende der passiven Faser ist zusätzlich ein 350 μm langes Stück Multimodenfaser angespleißt, um die Intensität pro Fläche am Faserausgang durch die

²² Internetrecherche am 09.02.2020: <https://www.laserdiodesource.com>

Strahl-Aufweitung zu reduzieren. Des Weiteren dient das passive Faserende zum Auskoppeln des im ersten Mantel verbleibenden Pumplichts. Ist der Brechungsindex des Mediums außerhalb des ersten Mantels größer, wird das Licht aus dem Mantel ausgekoppelt.²³ Ohne Auskopplung wird das Pumplicht durch den optischen Aufbau auf die Probe fokussiert und würde diese thermisch belasten oder die Ramanmessung stören.

Wie in den Abschnitten zuvor wird das Verhältnis aus ASE und Laserpuls ermittelt. Abbildung 4-10 zeigt das OSA-Spektrum nach der finalen Verstärkerstufe. In der letzten Stufe ist kein LLF verbaut, sodass in dieser Stufe erzeugtes ASE sowie durch spontane Ramanstreuung²⁴ entstandene Anteile nicht herausgefiltert werden und die Probe belasten bzw. das Experiment stören können. Hierzu wurde das Laserausgangsspektrum im Bereich von 1000-1140 nm aufgenommen und im oberen Spektrum von Abbildung 4-10 abgebildet. Die gewählte Spitzenleistung der Pulse beträgt 1,6 kW und entspricht der maximal applizierbaren Leistung, ohne die Probe während der TICO-Raman Aufnahme zu schädigen. Der Laserausgang wurde nach dem Kollimator auf eine weiße Streuscheibe gerichtet und das gestreute Licht mithilfe einer Multimodenfaser aufgesammelt. Unabhängig von der gewählten spektralen Auflösung, ist kein ASE im Verstärkungmaximum von Ytterbium (~1030 nm) sowie keine spontane Ramanstreuung um 1122 nm sichtbar. Im gelben Graphen mit 2 nm spektraler Auflösung ist um 1035 nm eine geringe Zunahme der ASE zu sehen.

Für die Beurteilung des ASE-Anteils bei der Signalwellenlänge ist ein kleiner Bereich desselben Spektrums darunter dargestellt. Die Leistung nimmt im Integrationsbereich der Signalwellenlänge um ca. ~2 dB zu, wenn die spektrale Auflösung verringert wird. Außerhalb der Signalwellenlänge, im Filterfenster des LLFs (1063 nm), bleibt das Verhältnis aus Zunahme der ASE, durch die Verringerung der spektralen Auflösung erhalten (vgl. 20 pm zu 0,2 nm). Die stärkste Zunahme der Leistung ist für den Übergang von 20 pm auf 0,2 nm spektraler Auflösung zu beobachten. Zwischen 0,2 nm und 2 nm spektraler Auflösung nimmt die Leistung weniger stark zu. Derselbe Zusammenhang ist in der zweiten Stufe gegeben. Hieraus kann gefolgert werden, dass der Sockel der Signalwellenlänge in den letzten beiden Stufen mehr Verstärkung erfährt.

²³ Die benötigte Totalreflexion für die Lichtpropagation im ersten Mantel, wird über ein Polymer mit kleinem Brechungsindex umgesetzt. Das Polymer wird beim Spleißen entfernt, wobei die Luft als Medium mit kleinem Brechungsindex dient. Ein Knickschutz kann um den Spleiß gelegt werden, um das Pumplicht auszukoppeln.

²⁴ In auf Siliziumoxid basierenden Glasfasern kann durch spontane Ramanstreuung das Laserlicht um 14,4 THz Stokes verschoben werden, was für die Wellenlänge bei 1064 nm zu einer Stokesverschiebung um ~1122 nm führt. Der Einfluss der spontanen Ramanstreuung ist von der Leistung und der Interaktionslänge abhängig.

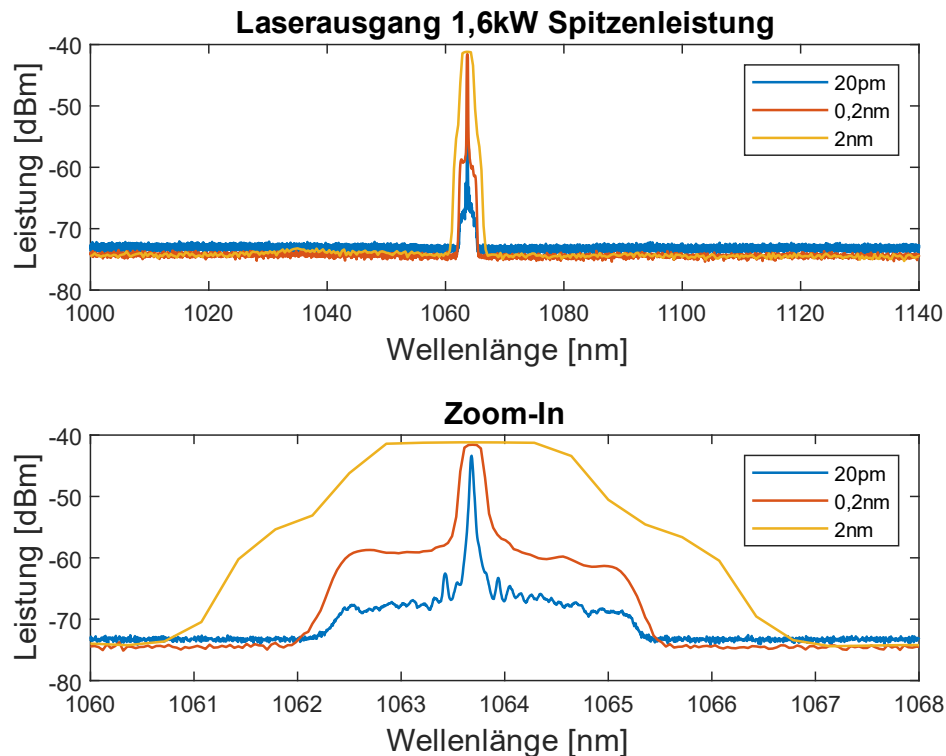


Abbildung 4-10 OSA-Spektrum für das Signallicht bei 1064 nm der Doppelmantel-Ytterbium-Stufe aufgenommen mit unterschiedlichen spektralen Auflösungen. Die Leistung nimmt im Integrationsbereich um die Signalwellenlänge um ~ 2 dB zu durch die geänderte spektrale Auflösung.

Wie zuvor bereits angemerkt, wird die Spitzenleistung der Laserpulse bis in den Kilowattbereich verstärkt. Diese hohen Leistungen können nicht direkt gemessen werden. Die Messung über einen thermischen Messkopf ist ungenau, da der ASE-Anteil nicht berücksichtigt werden kann. Für die zeitaufgelöste Messung werden die Pulse über einen optischen Strahlengang gezielt abgeschwächt.

Für die Charakterisierung des Pumpasers wurde der Pumpstrom der Multimoden-Diode im Doppelmantelfaserverstärker sukzessiv erhöht und die Leistung der Pulse zeitaufgelöst vermessen. In Abbildung 4-11 ist links der zeitaufgelöste Laserpuls für eine Leistung von 1,6 kW aufgetragen. Es zeigen sich keine Abweichungen von den initial verwendeten Startpulsen aus Abbildung 4-5. Bei hohen Spitzenleistungen der Pulse konnte gezeigt werden, dass ein wesentlicher Anteil der Leistung durch Ramanstreuung in der Glasfaser verschoben wird und zu einem Leistungseinbruch in der Mitte des zeitlich aufgelösten Laserpulses führt [94]. Die 750 ps langen Pulse, die moderate Leistung und die Faserlänge von ca. 3 m nach dem Strahlkombinierer sorgen für einen Laserbetrieb ohne den Einfluss von nichtlinearen Effekten. Rechts in Abbildung 4-11 ist die Spitzenleistung der Pulse am Laserausgang für die unterschiedlichen Pumpströme der Multimoden-Diode aufgetragen. Die Laserschwelle der Multimode-Pumpdiode liegt bei 630 mA. Ausgehend vom Laserswellenstrom (630 mA) erzeugt die Multimodediode für jedes Ampere ~ 1 W optische Leistung. Die Werte bis einschließlich 1 A zeigen, dass zuerst die Verluste der Verstärkerstufe ausgeglichen werden müssen. Ab einer Pumpleistung von

1,5 A steigt die Leistung an, folgt aber nicht der erwarteten linearen Zunahme der Spitzenleistung. Die maximale Leistung wird bei 4,5 A mit 2,45 kW Spitzenleistung der Pulse erreicht. Bereits ab 3,5 A geht die Verstärkung in Sättigung über. Die Länge der aktiven Faser wurde ursprünglich für eine andere Laserdiode des Masterszillators optimiert, die mehr initiale Leistung für die Startpulse zur Verfügung gestellt hat.²⁵ Die maximale verwendbare Leistung ohne thermische Schäden an den biologischen Proben zu verursachen beträgt $\sim 1,6$ kW, die im „linearen“ Verstärkungsbereich des Lasers bei 3 A erreicht werden, sodass auf eine Optimierung des Pumplasers für eine maximale Ausgangsleistung verzichtet wurde. Die Leistungsangabe bezieht sich auf den aktuellen TICO-Raman-Aufbau und ist nicht allgemeingültig für andere SRS-Systeme. In der alten Konfiguration des Lasers wurde diese Leistung bereits bei 2 A erreicht. Sollte die aktuelle Laserkonfiguration angepasst werden, müsste für eine lineare Zunahme der Spitzenleistung bis 2,45 kW die aktive Faser der letzten Stufe gekürzt werden. Für höhere Spitzenleistungen könnte eine dritte kerngepumpte Verstärkerstufe aufgebaut werden oder die aktive Faser der letzten Stufe verlängert werden. Ein zusätzlicher Doppelmantelverstärker ist ebenso denkbar.

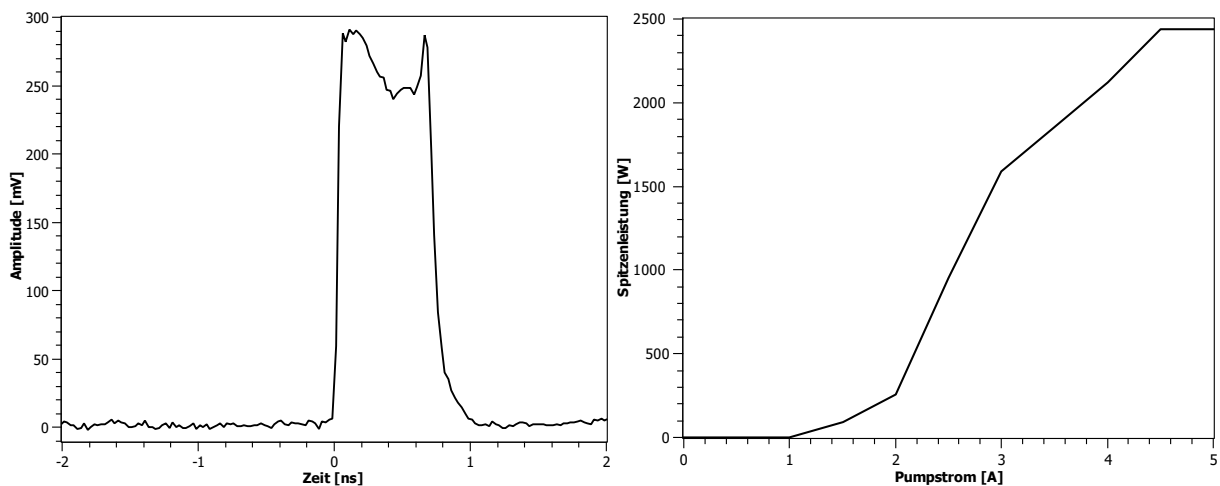


Abbildung 4-11 Links: Zeitaufgelöster Laserpuls am Faserausgang für einen Pumpstrom von 3 A (entspricht ca. $\sim 2,5$ W optischer Leistung). Puls zeigt keinerlei Veränderungen durch nichtlineare Effekte (Vgl. Abbildung 4-5) Rechts: Spitzenleistung der Laserpulse gegenüber dem Pumpstrom im Doppelmantelverstärker. Die Länge der aktiven Faser ist nicht optimal. Der Laser zeigt lediglich im Bereich von 2-3 A ein lineares Verstärkungsverhalten. Unter 2 A werden die Verluste der Stufe kompensiert. Über 3 A tritt bereits ein Sättigungsverhalten für die Verstärkung ein.

²⁵ Alte Laserdiode des Masterszillators ist Lumics LU1064M200, die nach dem EOM Laserpulse von ~ 80 mW zur Verfügung gestellt hat. Die sechzehnfache Leistung im Vergleich zur verwendeten DFB-Diode konnte nur erreicht werden, indem die maximal applizierbare optische Leistung am EOM-Eingang von 100 mW überschritten wurde.

4.2.2 FDML-Laser

Der Fourier Domänen Moden gekoppelte (engl. Fourier domain mode locked - FDML) Laser wurde 2006 von Huber et al. [51] für die optische Kohärenz-Tomographie (OCT) entwickelt. Die hohen Abstimmgeschwindigkeiten von einigen Megahertz über einen Abstimmbereich von bis zu 150 nm [52-55, 95, 96] erlauben eine OCT-Bildgebung mit Videoraten [52, 97]. Neben OCT-Anwendungen wird der FDML-Laser für die Umsetzung des TICO-Raman Konzepts genutzt. Seine geringe instantane Linienbreite [52, 55] und das geringe Rauschen [53, 57, 98] erlauben eine hohe spektrale Auflösung von $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ [56] mit einer Sensitivität am Schrotrauschlimit [57]. FDML-Laser werden mit einer Zentralwellenlänge von 1550 nm, 1300 nm und 1060 nm gebaut. Die Zentralwellenlänge ist durch die verfügbaren optischen Halbleiterverstärker bestimmt. Die Kombination aus FDML-Wellenlänge und der Wellenlänge des Pumpulses bestimmt die spektrale Abdeckung des Ramansystems.

FDML-Laser sind Ringlaser, bei denen die Umlaufzeit des Lichts an die Frequenz des abstimmbaren Filters angepasst sind. In kurzen Ringlasern muss sich beim Verstellen der Transmissionswellenlänge des abstimmbaren Filters die Lasertätigkeit in einigen Umläufen neu aufbauen. Im Fall von FDML-Lasern wird das Licht durch eine Faserspule verzögert, um ein exaktes Timing aus Filterposition und Lichtumlaufzeit zu erhalten. Der schematische Aufbau eines FDML-Lasers ist in Abbildung 4-12 dargestellt.²⁶ Ein Halbleiterlaserverstärker (engl. semiconductor optical amplifier, SOA) erzeugt ASE. Auf beiden Seiten des SOA sind optische Isolatoren verbaut. Dies schützt den SOA sowie den Filter vor zurücklaufendem Licht, welches den Betrieb des Lasers stören kann. Das Licht wird über einen Faserkoppler ausgekoppelt.²⁷ Zum Anpassen der Lichtumlaufzeit an die Filterfrequenz wird eine Verzögerungsspule genutzt (delay). Um möglichst viel Dispersion 1. Ordnung zu unterdrücken, können unterschiedliche Fasertypen gezielt kombiniert werden. Die Korrektur der 2. und 3. Ordnung der Dispersion wird über Faser-Bragg-Gitter umgesetzt [96], wobei die zuvor gewählte Faserkombination auf das verwendete FBG feinabgestimmt wird, um eine optimale Dispersionskorrektur zu erhalten. Die Transmissionseigenschaften des Filters sowie die Verstärkung des SOA sind polarisationsabhängig, sodass Polarisationscontroller (PC) verbaut sind. Ein wesentliches Bauteil des FDML-Lasers ist der abstimmbare fasergekoppelte Fabry-Perot-Filter (engl. Fiber Fabry -Perot tunable filter, FFP-TF), der mit einer sinusförmigen Wellenform angesteuert wird. Die Offsetspannung der Wellenform stellt die Zentralwellenlänge ein, wohingegen die Amplitude die Größe des Abstimmbereichs bestimmt. Die Filterfrequenz liegt im Bereich von 390-420 kHz. In einer Periode stimmt der Laser somit zweimal über den zuvor eingestellten Wellenlängenbereich ab, wobei die Halbperioden als Vorwärts-Sweep und Rückwärts-Sweep bezeichnet werden. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Linienbreite des FDML-

²⁶ Das gezeigte Schema stellt ein mögliches FDML-Design dar und dient der Veranschaulichung des FDML-Prinzips. Weitere Varianten mit zweifachem Durchlauf der Verzögerungsspule und zusätzlichem Faser-Bragg-Gitter für die Dispersionskorrektur sind aktueller, aber nicht nötig für die Einführung des FDML-Prinzips.

²⁷ Neben der Auskopplung durch einen optischen Koppler wird das FDML-Licht in einigen Konfigurationen durch das optische Fasergitter für die Dispersionskorrektur ausgekoppelt, welches hier nicht dargestellt ist.

Lasers, die durch die Finesse des FFP-TF gegeben ist. Aktuellste Generationen von FFP-TF erreichen eine Finesse²⁸ von über 3000 [99] und stellen mit einer Dispersions-Restfehlpassung kleiner 100 fs [53] die technologisch fortschrittlichsten FDML-Laser dar. Ein weiterer wichtiger Parameter beschreibt den optimalen Arbeitspunkt (engl. sweet spot) des FDML-Lasers, der durch minimales Intensitäts- und Phasenrauschen gekennzeichnet ist. Für aufwendig kompensierte FDML-Laser ist der Sweet-Spot ca. 100 nm breit. Ein möglichst großer Sweet-Spot-Bereich ist für TICO-Raman von Vorteil, sodass die fortschreitende Weiterentwicklung der FDML-Technologie auch die Weiterentwicklung von TICO-Raman Anwendungen begünstigt.

Zum Erzeugen der Multi-Megahertz Abstimmraten muss die initiale Abstimmfrequenz des Filters von ~400 kHz vervielfältigt werden. Hierfür wird der SOA des FDML-Lasers moduliert und der Sweep nach Auskopplung aus dem FDML-Resonator optisch kopiert und wohl definiert verzögert [100] (engl. optical buffering). Der Leistungsverlust durch das mehrmalige optische Kopieren wird durch einen zusätzlichen SOA nach der Buffer-Stufe kompensiert. Neben der höheren Abstimmrate des FDML-Lasers wird ein unidirektionales Abstimmen der Wellenlänge erreicht, da nur der Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sweep für das optische Kopieren genutzt wird.

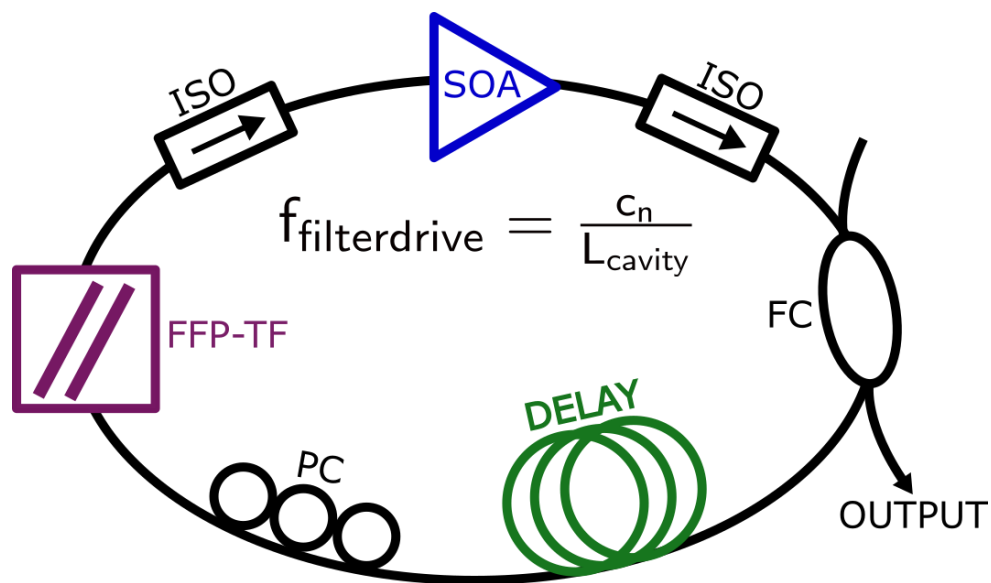


Abbildung 4-12 Vereinfachte Darstellung eines FDML-Lasers: ISO: Optische Isolatoren; SOA: Semiconductor Optical Amplifier, FFP-TF: Fiber Fabry Perot Tunable Filter, PC: Polarisations Kontrolle, Delay: Glasfaserspule als Verzögerungsstrecke, FC: Fiber Coupler

²⁸ Die Finesse der FFP-TF liegt üblicherweise im Bereich zwischen 200-500 und ist maßgeblich von der Vergütung der Faserendflächen im Filter abhängig.

4.2.2.1 1300 nm FDML-Laser

Der verwendete 1300 nm FDML-Laser erlaubt eine Messung im Fingerprint-Bereich für die Kombination mit 1064 nm als Pump-Wellenlänge für den SRS-Prozess. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete FDML-Laser wurde nicht selbst aufgebaut und wurde leihweise für die TICO-Raman Messungen genutzt. Der genaue Aufbau sowie zusätzliche Informationen sind in [53, 101, 102] zu finden. Im Gegensatz zu dem im Abschnitt zuvor gezeigten Schema, wird für diesen FDML-Laser ein Faser-Bragg-Gitter für die Dispersionskorrektur genutzt, welches für den Wellenlängenbereich von 1240-1390 nm ausgelegt ist. Die Frequenz des FFP-TF beträgt ~ 418 kHz. Entscheidend ist die Breite des Wellenlängen-Abstimmbereichs im optimalen Arbeitspunkt des FDML-Lasers, da hier nahe am Schrotrauschlimit gemessen werden kann, was ein wesentlicher Parameter für die Messung der kleinen Signale im Fingerprintbereich ist. Es hat sich gezeigt, dass der FDML-Laser zum Zeitpunkt der durchgeführten TICO-Raman Messungen bei einer Zentralwellenlänge von 1290 nm und einem Abstimmbereich von 40-45 nm am rauschärmsten zu betreiben ist. Dieser Abstimmbereich deckt den spektralen Bereich von ca. $1500-1800$ cm^{-1} ab. In Abbildung 4-13 ist der zeitaufgelöste Sweep des verwendeten FDML-Lasers für zwei unterschiedliche Filterfrequenzen und Analogbandbreiten des Oszilloskops dargestellt. Die Messung wurde mit einer u^2t -Photodiode (Analogbandbreite 50 GHz) und einem Keysight Infiniium Oszilloskop (DSOZ634A) mit einer Analogbandbreite von 33 GHz aufgenommen. Der FDML-Laser wird nicht moduliert betrieben. Die linke Spalte zeigt den Betrieb des Lasers im Sweet-spot-Bereich mit einer Filterfrequenz von 418,232 kHz. In der oberen Aufnahme wurde die volle Bandbreite der Eingänge mit geringerer Analogbandbreite des Oszilloskops von 33 GHz genutzt, wohingegen für die untere Aufnahme die Bandbreite auf 1 GHz gesenkt wurde. Für die obere Aufnahme mit voller Bandbreite tritt in einigen Teilen des Sweeps mehr Rauschen auf als in anderen Bereichen. Selbst für einen kleinen Abstimmbereich von ~ 45 nm liegt keine vollständige Dispersionskorrektur vor, die für das Intensitätsrauschen mitverantwortlich ist. Für den Vergleich zu einem nicht optimal eingestellten FDML-Laser wurde die Filterfrequenz um positive 16 Hz verschoben. Die Ergebnisse sind in der rechten Spalte in Abbildung 4-13 dargestellt. Das Intensitätsrauschen ist hier über den gesamten Sweep verteilt, lediglich die Umkehrpunkte weisen durch die langsamere Abstimmgeschwindigkeit weniger Rauschen auf, da der Laser mehr Zeit hat, sich auf die neue Filterbedingung einzustellen. Die Frequenz des Intensitätsrauschens ist hauptsächlich auf die Filtereigenschaften des FDML-Lasers zurückzuführen. Die Linienbreite des verwendeten FDML-Lasers beträgt $\sim 0,16$ nm. Bei einer Fehlanpassung aus Filterposition und Wellenlänge baut sich das gespeicherte Feld innerhalb des Fabry-Perot-Filters ab und muss anschließend durch nachfolgendes Licht wieder neu aufgebaut werden. Dieser Prozess ist wie bereits erwähnt von der Linienbreite und der Finesse des Filters abhängig. Für den verwendeten 1300 nm FDML-Laser beträgt die Länge dieser Intensitätseinbrüche ca. 50 ps [53].

Auffällig ist, dass sich die Aufnahmen mit einer Bandbreite von 1 GHz kaum unterscheiden. Das hohe Intensitätsrauschen für eine verstellte Filterfrequenz kann nur mit hohen Analogbandbreiten detektiert

werden. Für OCT-Anwendungen mit FDML-Lasern konnte für Analogbandbreiten größer 4 GHz ein Intensitätsrauschen von 100% beobachtet werden [103]. Für moderate Analogbandbreiten von ~1 GHz konnte gezeigt werden, dass das hochfrequente Rauschen die OCT-Bildqualität verschlechtert, obwohl das Rauschen außerhalb der Bandbreite des Detektors liegt [53]. Mitverantwortlich für die schlechtere OCT-Bildqualität ist nicht nur das Intensitätsrauschen, sondern die durch die Intensitätseinbrüche bedingte Änderung der Phase [53].

Die schlechtere Bildqualität in OCT-Aufnahmen kann nicht auf TICO-Raman übertragen werden. Erstens ist die Erzeugung des SRS-Signals nicht von der Phase abhängig (vgl. Abschnitt 3.2.2). Zweitens können die kurzen Intensitätseinbrüche von ~20 ps nicht durch die Bandbreite von 1 GHz im TICO-System aufgelöst werden. Nimmt man die Abschätzung der 90-10-Anstiegszeit mit $RT[ns] = \frac{0,35}{BW[GHz]}$ (RT Risetime, BW Bandwidth) hinzu, beträgt der 20 ps lange Intensitätseinbruch nur $\sim \frac{1}{17}$ des minimal aufzulösenden Signals von 350 ps. Der Einfluss des Intensitätsrauschens wird durch die analoge sowie digitale balancierte Detektion weiter reduziert (vgl. Abschnitt 4.3.3), sodass eine Messung am Schrotrauschlimit ermöglicht wird.

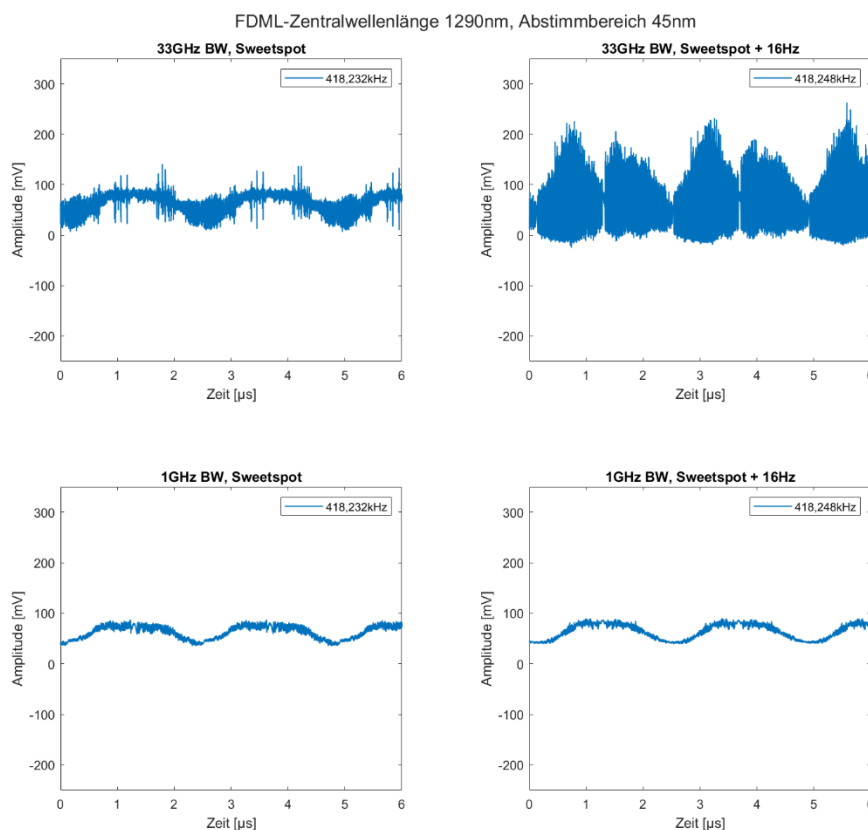


Abbildung 4-13 Zeitaugelöster Sweep des verwendeten 1300 nm FDML-Lasers. Aufgenommen mit u²t XPDV2320R-VF-SP Photodiode mit einer Analogbandbreite von 50 GHz und Keysight Infiniium Oszilloskop mit 33 GHz Analogbandbreite. Die linke Spalte stellt den FDML-Laser im Sweetspot dar, aufgenommen mit maximaler Bandbreite von 33 GHz (oben) und 1 GHz (unten). Dieselbe Messung ist links um eine 16 Hz verstellte Filterfrequenz abgebildet.

Abbildung 4-14 zeigt das Spektrum des verwendeten FDML-Lasers mit einer Zentralwellenlänge von 1290 nm über einen Abstimmbereich von 45 nm, wie er im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Die höhere Intensität an den Rändern des FDML-Lasers ist durch die geringe Abstimmgeschwindigkeit an den Umkehrpunkten der Sinus-Wellenform für den Fabry-Perot-Filter gegeben. Der FDML-Laser scheint erhöhte Verluste im Resonator zu haben. Dies ist an dem hohen ASE-Untergrund außerhalb des Abstimmbereichs zu erkennen. Die höheren Verluste könnten, neben der nicht optimalen Dispersionskorrektur, für den kleinen Sweepsbereich von 40-45 nm verantwortlich sein. Abstimmbereiche von ~100 nm im Sweepsbereich wurden bereits für 1300 nm FDML-Laser gezeigt [53, 104].

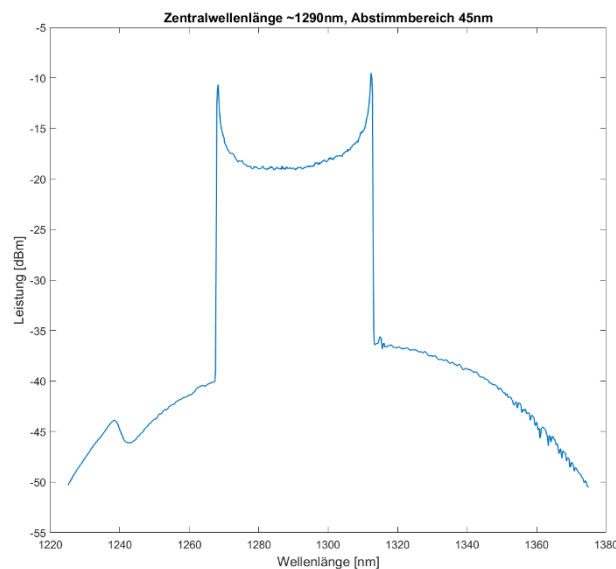


Abbildung 4-14 Laserspektrum des 1300 nm FDML-Lasers aufgenommen mit einem optischen Spektrum-Analysator (OSA). Der FDML-Laser wird um eine Zentralwellenlänge von 1290 nm, in einem Abstimmbereich von 45 nm um die Zentralwellenlänge betrieben. Die Intensitätserhöhung an den Rändern des FDML-Sweeps ist durch die Umkehrbewegung des FFP-TF gegeben (sinusförmige Wellenform).

4.2.2.2 1500 nm FDML-Laser

Der zweite verwendete FDML-Laser hat eine Zentralwellenlänge von 1550 nm und lässt sich über einen Bereich von 120 nm abstimmen. Im Vergleich zum FDML-Laser bei 1300 nm ist weder eine Temperaturregulierung des FDML-Lasers noch eine zusätzliche Dispersionskorrektur über ein Faser-Bragg-Gitter umgesetzt. In Abbildung 4-15 ist das Ausgangsspektrum des FDML-Lasers bei einer Zentralwellenlänge von 1545 nm über einen Abstimmbereich von 75 nm zu sehen. In Kombination mit der Pumpwellenlänge bei 1064 nm wird der Wellenzahlbereich von $2780\text{-}3080\text{ cm}^{-1}$ abgedeckt. Im Vergleich zum Spektrum des 1300 nm FDML-Lasers aus Abbildung 4-14 ist kein ASE-Untergrund des SOA außerhalb des Abstimmbereichs zu erkennen. Dies kann auf geringe Verluste im Laser zurückzuführen sein.

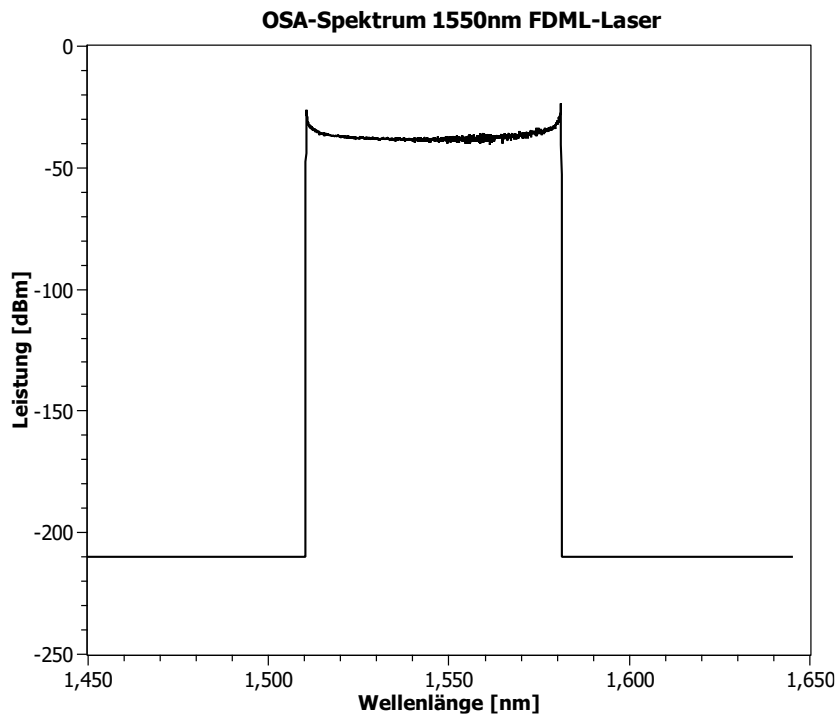


Abbildung 4-15 Laserspektrum des 1550 nm FDML-Lasers bei einer Zentralwellenlänge von 1545 nm und einem Abstimmbereich von 75 nm, aufgenommen mit einem optischen Spektrums Analysator (OSA).

Wie zuvor wird der FDML-Laser zeitlich aufgelöst betrachtet (vgl. Abbildung 4-16). Die Aufnahme wurde wie bisher mit einer u^2t -Photodiode (Analogbandbreite 50 GHz) und dem Keysight Oszilloskop (DSOZ634A, 33 GHz Analogbandbreite) aufgenommen. Dieselbe Messung wie für den 1300 nm Laser wurde durchgeführt. Die linke Spalte zeigt den FDML-Laser mit optimaler Frequenz von 407,188 kHz aufgenommen mit einer Analogbandbreite von 33 GHz im Vergleich zur Aufnahme mit 1 GHz. Die rechte Spalte zeigt den Laser mit einer um +16 Hz verschobenen Filterfrequenz von 407,204 kHz. Aufgrund der fehlenden Dispersionskorrektur sind für beide Filterfrequenzen, auch für große Bandbreiten, ein hohes Intensitätsrauschen erkennbar. Die Bereiche mit weniger Rauschen in der rechten Aufnahme stellen die Umkehrpunkte des FDML-Lasers dar. In der linken Aufnahme ist neben den Umkehrpunkten in jedem Sweep, ein zusätzlicher Bereich mit wenig Rauschen zu erkennen. Hierbei handelt es sich um den Sweetspotwellenlängenbereich, der durch die schlechtere Dispersionskorrektur weniger breit ist, als für den 1300 nm FDML-Laser.

Die Aufnahmen mit 1 GHz Bandbreite zeigen weniger Intensitätsrauschen: Für die um +16 Hz verstellte Aufnahme ist jeweils ein Sweep jeder FDML-Periode rauschärmer. Dies ist für die Aufnahme im Sweetspot mit 1 GHz nicht erkennbar. Für die 1 GHz Bandbreite lassen sich für beide Filterfrequenzen die Zeitpunkte beim Übergang von rauscharmen Bereichen zu Bereichen mit mehr Rauschen in der Aufnahme mit voller Bandbreite ausmachen. Zudem zeigt der Sweep mit +16 Hz verstellter Filterfrequenz, aufgenommen mit voller Bandbreite, in der Aufnahme mit 1 GHz weniger Rauschen.

Dies könnte durch die hohe Anzahl an Intensitätseinbrüchen bedingt sein, die durch das Mitteln vieler Intensitätseinbrüche bei der Aufnahme mit 1 GHz Bandbreite zu weniger Rauschen führt.

Trotz des geringen Aufwands für die Dispersionskorrektur können mit dem 1550 nm FDML-Laser verlässlich TICO-Raman Daten aufgenommen werden. Der Einfluss der schlechteren Dispersionskorrektur, scheint einen weniger großen Einfluss als im 1300 nm FDML-Laser zu haben. Dies könnte auf die größere Linienbreite des Filters von 0,4 nm und die kleinere Finesse zurückzuführen sein. Liegt eine Fehlanpassung zwischen Wellenlänge und Filterposition vor, wird durch die größere Linienbreite mehr Dispersionsfehlanpassung vom Filter toleriert. Gleichzeitig baut sich bei zu großer Fehlanpassung das Feld innerhalb des Filters schneller ab, sodass der Intensitätseinbruch kürzer ist.

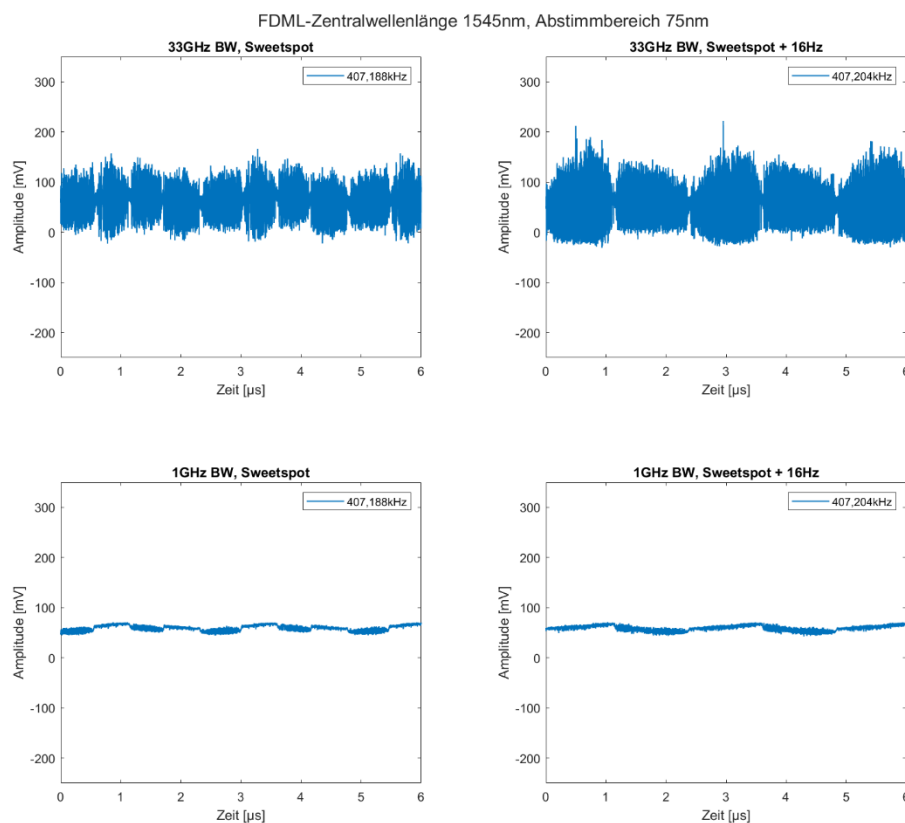


Abbildung 4-16 Zeitaufgelöste Aufnahme des 1550 nm FDML-Lasers für zwei unterschiedliche Filterfrequenzen. Die linke Spalte stellt den FDML-Laser im Sweetspotbetrieb, aufgenommen mit unterschiedlichen Analogbandbreiten. Die Aufnahme mit hoher Bandbreite zeigt ein hohes Intensitätsrauschen durch eine fehlangepasste Lichtlaufzeit. Die Aufnahme mit geringer Bandbreite unten zeigt weniger Rauschen und entspricht der Analogbandbreite des TICO-Raman Systems. Die rechte Spalte stellt dieselbe Aufnahme mit einer um +16Hz verstellten Filterfrequenz dar.

4.3 TICO-RAMANSYSTEM

Dieses Kapitel umfasst den optischen Aufbau, die Scanmethode für die Aufnahme der TICO-Raman Bilder sowie die Detektion des TICO-Ramansignals. Dies schließt die Synchronisation des Systems und die Wellenzahlberechnung aus den zeitcodierten Ramansignalen ein. Abschließend wird auf die merkmalsorientierte Abtastung des Ramanspektrums eingegangen, welche als Sparse-Sampling bezeichnet wird.

4.3.1 Strahlengang

Der optische Strahlengang hat zwei wesentliche Aufgaben. Zum einen muss das Proben-Licht der FDML-Laser mit den Laserpulsen des Pumplasers optimal auf der Probe überlappt werden. Zum anderen muss gewährleistet werden, dass nach Transmission durch die Probe das Pumplicht vollständig unterdrückt wird und die Intensitätsänderung des FDML-Lichts durch SRG möglichst effektiv detektiert werden kann. Die Detektion des Ramansignals erfolgt durch eine doppelte Balancierung, um den großen Untergrund vom SRG-Anteil zu trennen. Die zwei Photodioden für die Balancierung werden durch zwei unterschiedliche Strahlengänge beleuchtet. Der erste Strahlengang heißt Probenarm und dient der Erzeugung des Ramansignals. Der zweite Arm stellt die Referenz dar, die einen genauen zeitlichen Überlapp des FDML-Lichts am Detektor gewährleistet und die Leistung in beiden Armen für die Balancierung anpasst. Das FDML-Licht wird durch einen 50/50-Faserkoppler aufgeteilt, sodass für jeden Arm 50% der initialen Leistung zur Verfügung steht.

In Abbildung 4-17 ist der schematische Aufbau des optischen Strahlengangs des Probenarms dargestellt. Der Faserausgang des Pumplasers (PLMA-GDF-10/125-M mit 350 μm Multimodenendstück) wird mit einer Kollimatorlinse (Thorlabs, C280 TMD-C $f=18,4\text{mm}$, $NA=0,15$) kollimiert. Zur Anpassung der Polarisation an die Polarisation des FDML-Lasers ist eine $\frac{\lambda}{2}$ -Platte (Thorlabs, WPH05M-1064) verbaut.²⁹ Dieselbe Kollimatorlinse wird für den SMF-Faser-Ausgang des FDML-Lasers verwendet. Beide Strahlen werden durch einen dichroitischen Langpassfilter vereinigt.³⁰ In Abhängigkeit vom verwendeten FDML-Laser muss die Kollimation der beiden Laser sowie der Langpassfilter zur Strahlvereinigung angepasst werden. Nach der Strahlvereinigung folgt eine Linse (Thorlabs, C230TMD-C, $f=4,5\text{ mm}$, $NA= 0,54$) für die Fokussierung auf der Probe. Durch die Wellenlängendifferenz von bis zu 500 nm zwischen den Laserquellen muss die Kollimation des 1064 nm Lichts angepasst werden, um dieselbe Fokusebene für beide Strahlen zu gewährleisten.³¹ Nach

²⁹ Ein Anpassen der FDML-Polarisation an die Polarisation des Pumplasers ist nachteilig, da die Langpassfilter zum Blocken des Pumplichts unter dem Brewster-Winkel von 54° montiert sind. Die Polarisation des FDML-Lasers wird entsprechend auf minimale Reflektion an den Langpassfiltern eingestellt.

³⁰ Für optimale Ergebnisse wird der Langpassfilter für die Strahlvereinigung entsprechend dem verwendeten FDML-Laser gewechselt.

³¹ Die Pumpwellenlänge (1064 nm) benötigt gegenüber der Zentralwellenlänge (1550 nm) des FDML-Lasers eine Anpassung der Kollimation durch die chromatische Aberration der Fokussierlinsen.

der Probe wird die gleiche Linse zum erneuten Kollimieren der beiden Strahlen genutzt. Vor der Detektion des FDML-Lichts muss das hochintensive Pumplicht entfernt werden. Hierzu werden 4 baugleiche LP-Filter verwendet. Der erste Filter reflektiert den Großteil des Pumplichtes auf einen Graphitblock, der das hochintensive Pumplicht gefahrlos absorbiert. Nach der Entfernung des Pumplichts fokussiert eine dritte baugleiche Linse das verbleibende FDML-Licht, inklusive des SRG-Anteils, auf eine dual-balancierte Photodiode (Wieser-Labs, WL-BPD1Ga). Der Durchmesser der aktiven Fläche der Photodiode beträgt $300\ \mu\text{m}$. Der gesamte Detektor ist auf einem Drei-Achsen-Lineartisch montiert.

Der Referenzarm passt die Leistung und das zeitliche Timing gegenüber dem FDML-Licht des Probenarms an. Der Photodioden-Eingang des Referenzarms ist fasergekoppelt. Die Anpassung der Leistung wird manuell durch Abschattung einer auf einem Lineartisch montierten Rasierklinge umgesetzt. Das Licht wird zuvor durch eine Linse kollimiert. Die zweite baugleiche Kollimatorlinse für die Faserkopplung ist auf einer Schiene montiert und erlaubt es, die Länge der Referenzstrecke um $\pm 12,5\ \text{cm}$ zu ändern, um das Timing zwischen Referenz- und Probenarm genau anzupassen. Die Längen Anpassung des Referenzarms gleicht eine Abweichung von maximal $\pm 400\ \text{ps}$ aus, sodass die Referenzstrecke lediglich kleine Abweichungen kompensieren kann.

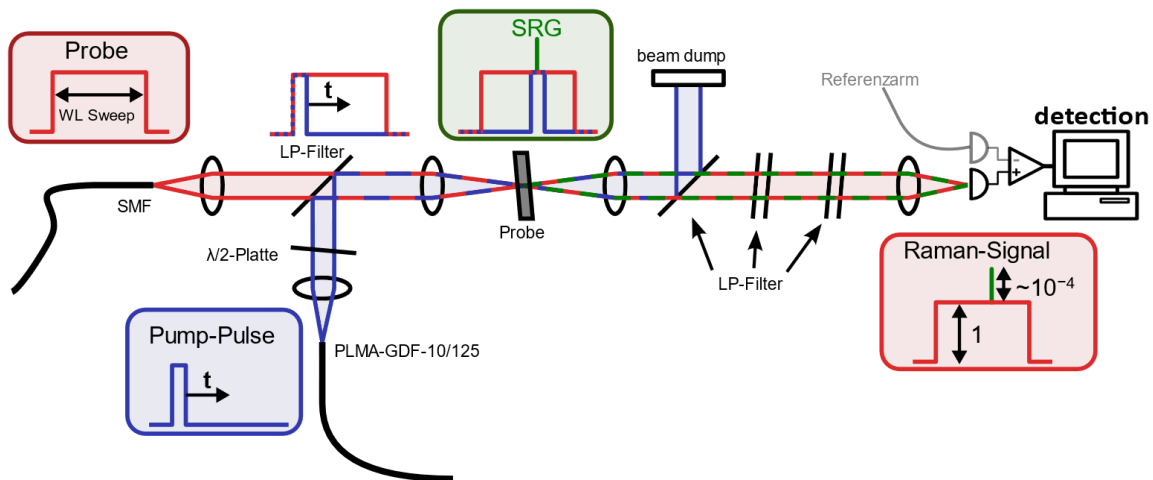


Abbildung 4-17 Schematischer Aufbau des optischen Strahlengangs des Probenarms. FDML-Laser (Probe, roter Strahlengang) und die Pump-Pulse (blauer Strahlengang) werden kollimiert und durch einen dichroitischen Langpassfilter (LP) vereinigt. Eine $\frac{\lambda}{2}$ -Platte nach dem Kollimator des Pumpasers erlaubt die Polarisation auf den FDML-Laser anzupassen. Mittels einer Linse werden beide Lichtquellen auf die Probe fokussiert, in der stimulierte Ramanstreuung als Intensitätsänderung des FDML-Lichts stattfinden kann (SRG). Eine baugleiche Linse sammelt das Licht auf und kollimiert es. Eine Reihe von Langpassfiltern (LP-Filter) blocken das hochintensive Pumplicht. Das verbleibende FDML-Licht wird mit einer Linse auf eine Photodiode des balancierten Detektors fokussiert.

4.3.2 Probennavigation

Im Vergleich zu Laser-Scanning-Mikroskopen, in denen der Laserstrahl zum Abfahren des Sichtfelds (engl. Field of view (FOV)) abgelenkt wird, ist im TICO-Aufbau das Verfahren der Probe umgesetzt. Beide Systeme haben Vor- und Nachteile, wobei die Bewegung der Probe nur sinnvoll ist, wenn die Aufnahmezeit länger ist, als die minimale Zeit die zum Verfahren der Probe benötigt wird oder wenn sehr große Bildfelder gewünscht sind. Laser-Scanning-Mikroskope können Linienraten von einigen Kilohertz erreichen[105, 106]. Hierbei ist die Aufnahme von großen Sichtfeldern erschwert, weil die verwendeten Objektive mit einer hohen numerischen Apertur (NA) für die mikroskopische Auflösung kleine Sichtfelder nach sich ziehen. Für größere Bildfelder wird eine Kombination aus Verfahren der Probe und Ablenkung des Anregungslichts genutzt, um die einzelnen kleinen Sichtfelder des Objektivs in einem Mosaik zusammenzusetzen.

Im TICO-Aufbau wird das Ramansignal in Transmission gemessen. Beim Abfahren des Sichtfelds durch Galvo-Scanner müssten die unterschiedlichen Winkel zum Ablenken des Lichts nach der Probe kompensiert werden, um zu gewährleisten, dass die Photodiode vom FDML-Licht getroffen wird. Bei einem Detektordurchmesser von 300 μm ist dies nicht ohne zusätzlichen Aufwand möglich, was in Kombination mit den langen Aufnahmezeiten das Verfahren der Probe begünstigt. Die Probe kann in drei Achsen bewegt werden, wobei die y- und z-Achse durch motorisierte Linearschlitten (Thorlabs, PT1/M-Z825B, 25 mm Verfahrweg) bewegt werden. Die maximale Geschwindigkeit von $2,6 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ der Spindel getriebenen Linearschlitten ist zu langsam für die x-Achse. Für die x-Achse wird ein magnetisch getriebener Linearschlitten (engl. Voice Coil Stage, VCS) (Physik Instrumente, V522-1AA) mit einem zusätzlichen Controller (Physik Instrumente, C-413-2GA) für die analoge Ansteuerung verwendet. Der Verfahrweg beträgt $\pm 2,5$ cm und erlaubt Scanfrequenzen von bis zu 10 Hz für den vollen Verfahrweg. Für größere Frequenzen reduziert sich die maximale Auslenkung des Linearschlittens. Wesentlich für die Qualität der verwendeten Linearschlitten ist ihre Auflösung und Wiederholungsgenauigkeit beim mehrmaligen Anfahren einer Position. Für die Thorlabs-Motoren der x- und y-Achse beträgt die minimale Schrittweite 50 nm. Für das bidirektionale Anfahren einer Position wird eine Genauigkeit von 1,5 μm angegeben. Das Umkehrspiel der Spindel-Motoren wird mit 8 μm angegeben. Bei der wiederholten Aufnahme desselben Bildes ergeben sich Unterschiede des abgedeckten Sichtfeldes, sodass in der LabView-Software bei der Rückfahrt zur Startposition über diese herausgefahren wird, um die gewünschte Startposition von derselben Seite anzufahren, was das Umkehrspiel der Motoren ausgleicht.

Für den schnellen Linearschlitten der x-Achse ist die minimale Schrittweite 20 nm, die bidirektionale Genauigkeit beträgt 120 nm. Das Umkehrspiel wird mit kleiner 1 μm angegeben. Für die unidirektionalen Aufnahmen sind keine Bildfehler aufgetreten, die zusätzlich kompensiert werden müssen. Für eine schnelle Bildaufnahme mit kurzen Totzeiten wurde eine bidirektionale Aufnahme des Bildes umgesetzt. Hierfür wird der Linearschlitten sinusförmig bewegt. Die Ansteuerung des Controllers

erfolgt analog. Durch Latenzen ergibt sich ein Phasenversatz aus Soll- und Ist-Position. Dieser Phasenversatz muss ausgeglichen werden, um Bildartefakte wie den Versatz jeder zweiten Zeile zu kompensieren (Reisverschluss-Artefakt). Weitere Bildartefakte müssen berücksichtigt werden, wie gespiegelte Bilder durch einen Phasenversatz der VCS gegenüber der Datenaufnahme. Hinzu kommen Bildverzerrungen durch die variierende Geschwindigkeit des Linearschlittens bei der sinusförmigen Bewegung.

Abbildung 4-18 zeigt drei Bildartefakte, die zum Zeitpunkt der Datenaufnahme nicht vollständig korrigiert waren. Links sind Polymethylmethacrylat-Kugeln mit einem Durchmesser von 20 μm für das Ramansignal bei 2945 cm^{-1} zu sehen. Erkennbar ist der Versatz der Zeilen (Reisverschluss) sowie in der Mitte des Bildes gestauchte, unrunde Kugeln durch die höhere Geschwindigkeit im Vergleich zum Rand des Bildes. Rechts ist das Ramansignal bei 2840 cm^{-1} für Lipid-Tröpfchen in humaner Haut dargestellt. Der Phasenversatz zwischen dem Sinus zum Ansteuern der VCS und der Datenaufnahme führt zu einer Spiegelung des Bildes am Umkehrpunkt des Sinus rechts der Bildmitte.

Es wurden verschiedene Rekonstruktionen softwareseitig umgesetzt, um eine bidirektionale Aufnahme möglichst ohne Artefakte zu implementieren. Neben der Anpassung der Phase, um die Umkehrpunkte der Sinus-Bewegung gegenüber der Datenaufnahme an den Bildrand zu verschieben, findet die Datenaufnahme nur während der „nahezu linearen“ Bewegung des Sinus statt und nicht im Bereich der Umkehrpunkte. Hierfür wurde das Trigger-Signal für den Aufnahmestart der ADC-Karte mit einem zusätzlichen Signal über ein elektronisches Und-Gatter verbunden. Das zusätzliche Signal gewährleistet die Datenaufnahme nur während der „linearen“ Phase des Sinus (vgl. Abbildung 4-19). Die Amplitude und Frequenz des Sinus wurde entsprechend angepasst, um einerseits das gewünschte Bildfeld aufzunehmen und andererseits die exakte Anzahl der benötigten Trigger-Signale für die Aufnahme einer Zeile innerhalb jeder Halbperiode des Sinus zu gewährleisten.

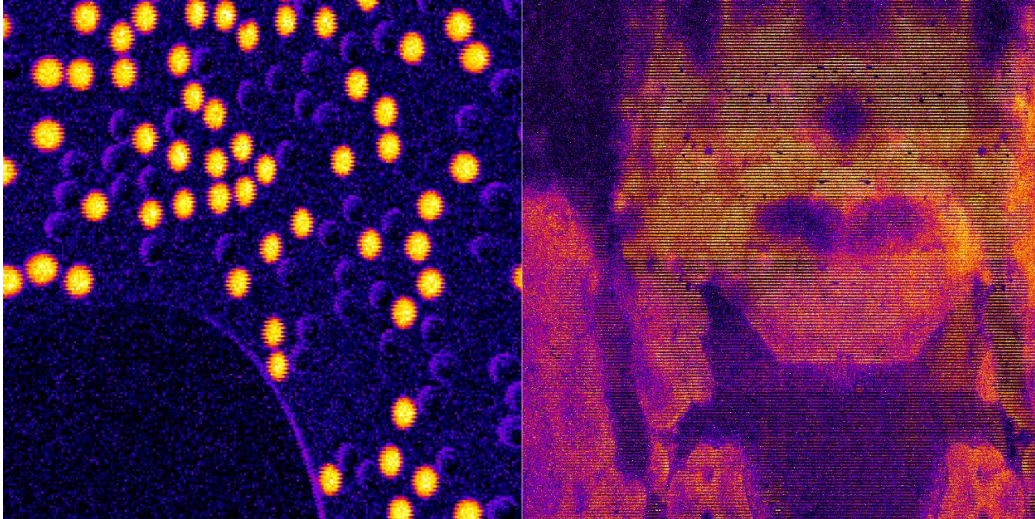


Abbildung 4-18 Bildartefakte beim Verwenden der Voice-Coil-Stage. Links: Reisverschluss-Artefakte an den 20 μm Polymethylmethacrylat-Kugeln durch Unterschiede für den Hin- und Rückweg bei der Aufnahme von zwei Zeilen. Unterschiedliche Größe der Kugeln am Rand im Vergleich zu den gestauchten Partikeln in der Mitte durch die höhere Geschwindigkeit des Linearschlittens. Rechts: Falsche Phase zwischen sinusförmiger Treiberwellenform für die VCS und der Datenaufnahme. Umkehrpunkt der Sinus-Bewegung ist rechts der Mitte erkennbar.

Die Anpassung der Phase und die Datenaufnahme im „linearen“ Bereich des Sinus haben den Versatz jeder zweiten Zeile nicht vollständig behoben. In der Software lässt sich jede zweite Zeile des Bildes manuell verschieben, um diesen Versatz auszugleichen. Die Abweichung konnte für schnelle Aufnahmen mit einer Linienrate größer 20 Hz nicht vollständig ausgeglichen werden. Zudem war der Versatz jeder zweiten Zeile nicht konstant und konnte nicht perfekt kompensiert werden. Durch den externen Wellenzug als Referenz für die Input-Output Erfassungskarte (NI-PCI-6259), die in Phase zu allen anderen Wellenzügen des Systems ist, kann eine unzureichende Synchronisation der einzelnen Wellenzüge ausgeschlossen werden. Daher kann die Mechanik der VCS verantwortlich sein, was jedoch nicht endgültig geklärt wurde. In der Praxis hat sich für einen Großteil der biologischen Proben ein unidirektionales Aufnahmeschema mit einer Sägezahnkurve zum Ansteuern der VCS bewährt. Die größere Totzeit durch das Fahren zur Startposition kann bei Aufnahmezeiten von einigen Minuten vernachlässigt werden.

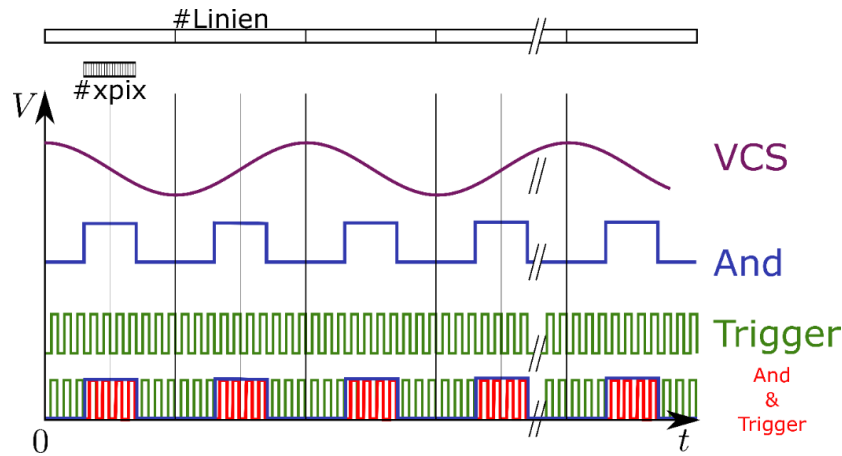


Abbildung 4-19 Verwendete Wellenformen für die Synchronisierung aus Digitalisierung und der Voice-Coil-Stage (VCS). Die VCS wird mit einer sinusförmigen Wellenform angesteuert. Für die Aufnahme innerhalb des linearen Bereichs des Sinus wird eine Rechteck-Wellenform (blau) mit dem Triggersignal für die Aufnahme eines TICO-Raman Spektrums über ein Und-Gatter verbunden. Die Frequenz und Amplitude der VCS-Wellenform sowie das Abtastverhältnis der AND-Wellenform werden in Abhängigkeit der benötigten Spektren einer Linie erzeugt und durch die Input-Output Erfassungskarte (NI-PCI-6259) ausgegeben.

4.3.3 Detektionsschema: Balancierung

Die Detektion des Ramansignals basiert auf einer zweifachen Balancierung des FDML-Lichts. Die erste Balancierung ist analog. Durch die synchronisierte Detektion wird ein zweiter digitaler Balancierungsschritt ermöglicht, der die Sensitivität der Detektion weiter erhöht und die Imperfektionen der analogen Balancierung kompensiert.

Das Ramansignal entsteht nur während der Überlagerung des FDML-Lichts mit dem Pump-Puls. Entsprechend ist das Ramansignal als Wechselsignal gegeben und die verwendete balancierte Photodiode AC-gekoppelt³², mit einer unteren Grenzfrequenz von 260 kHz. Die Transimpedanz-Verstärkung der Photodiode beträgt $3500 \frac{\text{V}}{\text{W}_{\text{optisch}}}$, was bei der verwendeten optischen Leistung von einigen mW des FDML-Lasers zu einer Spannung $>10 \text{ V}$ führen würde. Die AC-Kopplung der Photodiode und die analoge Balancierung unterdrücken den Offset $> 10 \text{ V}$. Die resultierende Spannung wird in den nutzbaren Bereich der ADC-Karte von $\pm 400 \text{ mV}$ reduziert.

Für die Detektion des Ramansignals ist entscheidend, wie gut das Ramansignal aufgelöst werden kann. Die Auflösung ist einerseits durch die analoge Detektionsbandbreite gegeben und andererseits durch den Dynamikbereich der Messung. Die 6 dB-Bandbreite der Photodiode beträgt 1 GHz und kann somit Laserpulse mit einer Anstiegszeit von 350 ps auflösen.³³ Die verwendeten Laserpulse haben eine Länge

³² AC steht für Wechselstrom (engl. alternating current).

³³ Abschätzung der Anstiegszeit (10 % zu 90 %) über $RT[\text{ns}] = \frac{0,35}{\text{BW}[\text{GHz}]}$, RT = Anstiegszeit, BW = Bandbreite

von 750 ps und somit auch das erzeugte Ramansignal. Für kürzere Pulse oder eine kleinere Bandbreite der Photodiode würde das Ramansignal zeitlich verbreitert werden und eine kleinere Amplitude haben, was nachteilig für die Messung ist. Der Dynamikbereich der Messung ist, neben der Balancierung, durch die effektive Anzahl von Bits (engl. effective number of bits, ENOB) der ADC-Karte gegeben. Im Allgemeinen ist die Speichertiefe des ADC mit 12 Bit angegeben, wovon 9 Bit effektiv zur Verfügung stehen. Ohne Balancierung müsste der gesamte Spannungsbereich von ~ 10 V in 512 Einheiten aufgeteilt werden, was nicht ausreichend ist für eine Messung am Schrotrauschlimit im Bereich von $\sim 10^{-4}$. Die analoge Balancierung unterdrückt die 10 V Offset in dem Eingangsspannungsbereich der ADC-Karte von ± 400 mV und erhöht den Dynamikbereich um den Faktor 12,5. Entsprechend muss der ENOB-Dynamikbereich um den Zuwachs des Dynamikbereichs durch die Balancierung korrigiert werden. Als Folge stehen 6400 diskrete Einteilungen zur Verfügung, sodass Änderungen im Bereich von $\frac{1}{6400} = 1,564 \cdot 10^{-4}$ aufgelöst werden können.

Die zuvor geschilderte Sensitivität der Detektion ist nur theoretisch nutzbar, da zusätzliche Störgrößen das Ramansignal überlagern. Das Laserrauschen des FDML-Lasers ist durch die Aufteilung in Proben- und Referenzarm in beiden Strecken gegeben, wird aber nicht vollständig durch die Balancierung unterdrückt, sodass Restmodulationen das Ramansignal stören. Hinzu kommen Modulationen durch Interferenzen des FDML-Lichts an den optischen Komponenten. Durch den großen Abstimmbereich von bis zu 150 nm, treten neben Interferenzen an den optischen Komponenten unterschiedliche Kopplungsverhältnisse beim Aufteilen des Lichts in den Referenz- und Probenarm auf. Über den Abstimmbereich des FDML-Lasers ist somit ein spektral abhängiger Intensitätsverlauf vorhanden, der das Ramansignal zusätzlich überlagert. Diese Störgrößen nehmen ca. $\frac{1}{7}$ des Eingangsspannungsbereich von ± 400 mV in Anspruch und verhindern eine Messung des Ramansignal am Schrot-Rausch-Limit [57].

Für die Kompensation der Imperfektionen der analogen Balancierung wird ein zusätzlicher digitaler Balancierungsschritt genutzt. Das TICO-Prinzip nutzt die Codierung des Ramansignals in der Zeit, was für die Aufnahme eines Spektrums bedeutet, dass in jeder neuen FDML-Periode der Pumpuls zu einem anderen Zeitpunkt und damit einer anderen FDML-Wellenlänge überlagert wird. Aufeinander folgende Sweeps des FDML-Lasers enthalten die Ramaninformation an unterschiedlichen Zeitpunkten. Für das digitale Balancieren wird nicht nur das FDML-Licht zum Zeitpunkt der Überlagerung mit dem Pumpuls digitalisiert, sondern der gesamte Sweep. Aufeinander folgende Sweeps können daher subtrahiert werden, da sie das Ramansignal an unterschiedlichen Zeitpunkten enthalten. Direkt aufeinander folgende Sweeps unterscheiden sich nur geringfügig, sodass die Imperfektionen der analogen Balancierung digital kompensiert werden können, was eine Messung des Ramansignals am Schrot-Rausch-Limit ermöglicht.[57]

4.3.4 Rauschcharakteristik und Sensitivität

Für TICO-Raman liegt das Ramansignal als SRG des FDML-Lasers vor. Als Folge ist das Intensitätsrauschen des Lasers mitentscheidend für die Sensitivität der Messung. Der Einfluss des Intensitätsrauschens auf das SNR der SRS-Messung wurde bereits im Grundlagenteil in Gleichung (3-17) gezeigt. Ist kein „excess noise“ des Abtastlasers (FDML-Laser) vorhanden, skaliert das SNR linear mit der Pumpleistung und mit der Quadratwurzel der Abtastleistung. Die untere Grenze für die Sensitivität oder Empfindlichkeit der Messung ist durch das Schrotrauschen gegeben: Die Anzahl am Detektor ankommender Photonen fluktuiert zwischen einzelnen Zeiträumen. Für Laserlicht folgt diese Fluktuation der Poisson-Statistik mit der Photonenanzahl n . Mit einer großen Anzahl von Photonen nähert sich die Poisson-Verteilung der Normalverteilung an, sodass das Schrotrauschen nicht vom Gaußschen Rauschen unterschieden werden kann. Als Folge ist die Standardabweichung des Schrotrauschens gleich der Quadratwurzel der Photonenanzahl n , sodass das SNR mit $\frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N}$ skaliert.

Für die Detektionseinheit soll das Schrotrauschen als Spannungsgröße angegeben werden. Zuvor wird der durch die Photodiode erzeugte Strom mit $I = \frac{en\eta}{t}$ eingeführt. Hierbei gibt η die Quanteneffizienz der Photodiode an, e die Elementarladung, t die Zeit und n die Anzahl an Photonen. Das durch das Schrotrauschen der Photonen abweichende quadratische Mittel (engl. Root mean square, RMS) des Photostroms kann über $I_{sn} = \sqrt{2eIf}$ berechnet werden[107].³⁴ Die Bandbreite des Detektors wird mit f angegeben. Die Responsivität der genutzten Photodioden beträgt $0,9 \frac{A}{W}$ mit einer analogen Bandbreite von 1 GHz. Die im Ergebnisteil vorgestellten Leistungen des FDML-Lasers betragen $\sim 4,5$ mW optische Leistung für den CH-Streckbereich und $\sim 2,8$ mW für die Aufnahmen im Fingerprint-Bereich. Daraus ergibt sich ein durchschnittlicher Photostrom von 4,05 mA für den CH-Streckbereich und 2,52 mA für den Fingerprintbereich, wobei der Strom durch die Verwendung von zwei Photodioden für die Balancierung mit 2 multipliziert werden muss. Der daraus resultierende Strom des Schrotrauschens I_{sn} beträgt $1,61 \mu A$ und $1,27 \mu A$. Die Transimpedanzverstärkung der Photodiode ist wellenlängenabhängig und beträgt $3500 \frac{V}{W}$ für 1300 nm und $3300 \frac{V}{W}$ für 1500 nm. Entsprechend kann die durch das Schrotrauschen bedingte Spannung für den CH-Streckbereich (1550 nm FDML) und den Fingerprintbereich (1300 nm) separat angegeben werden und entspricht $5,31$ mV für den CH-Streckbereich und $4,44$ mV für Messungen im Fingerprintbereich. Da nach der analogen Balancierung das Signal nochmals digital balanciert wird, muss das Schrotrauschen mit $\sqrt{2}$ multipliziert werden, da sich das Rauschen quadratisch addiert. Das finale Schrotrauschen beträgt für die verwendeten FDML-Laser $\sim 7,5$ mV und $\sim 6,3$ mV.

³⁴ Die Formel für die RMS-Abweichung des Stroms gilt nicht nur für Photoströme. Der Strom wird durch eine diskrete Anzahl von Elektronen gebildet deren Anzahl natürlich variiert, was ebenfalls durch das Schrotrauschen gegeben ist.

Ohne Balancierung würden sich Spannungen von $\sim 14\text{ V}$ und $\sim 10\text{ V}$ ergeben. Bezogen auf das Schrotrauschen von $\sim 7,5\text{ mV}$ und $\sim 6,3\text{ mV}$ können somit Intensitätsänderungen, in Abhängigkeit der verwendeten Laserquelle, von $5,3 \cdot 10^{-4}$ bzw. $6,4 \cdot 10^{-4}$ gemessen werden. Das Schrotrauschen ist somit größer als der Dynamikbereich der Messung, der im Abschnitt zuvor mit $1,56 \cdot 10^{-4}$ angegeben wurde.

4.3.5 Synchronisierung

Die Synchronisierung wird durch einen arbiträren Wellenform-Generator (engl. arbitrary waveform generator, AWG) umgesetzt (Aim TTi, Cambridgeshire, UK, TGA1244). Die vier Kanäle des AWG besitzen jeweils einen zusätzlichen TTL-Ausgang, der für die Synchronisierung genutzt werden kann. Der AWG wird in Master-Slave-Konfiguration betrieben, wobei die Wellenform für den FDML-Laser den Master darstellt.

Kanal 1 des AWG stellt die Signale für den Masteroszillator zur Verfügung, wie die Vormodulation für den Laser-Dioden-Treiber (engl. Laser diode driver, LDD). Der dem Kanal zugehörige Trigger dient als Eingangssignal für den Pulsgenerator (PG). Der zeitliche Versatz des Triggers gegenüber der Vormodulation wird fest in der arbiträren Wellenform gespeichert. Die Verzögerung (engl. delay) sowie die Pulslänge können mit dem PG feineingestellt werden.

Der zweite Kanal wird als externes Taktsignal für die NI-Karte genutzt, welche die Stellwerterzeugung für die VCS erzeugt und synchronisiert zur Frequenz des FDML-Lasers läuft, um die exakte Anzahl von spektralen Punkten für jeden Pixel des Bildes aufzunehmen.

Kanal drei ist der Masterkanal und gibt das Treibersignal für den Filtertreiber des FDML-Lasers aus. Die Phase des Signals kann angepasst werden, um die zeitliche Überlagerung des ersten Pumpulses mit dem Beginn eines FDML-Sweeps zu gewährleisten. Ohne Anpassung der FDML-Phase kann zwar ein Ramansignal gemessen werden, jedoch ist die Wellenzahlzuweisung falsch und das Ramanspektrum an den Umkehrpunkt des FDML-Sweeps gespiegelt.

Der vierte Kanal gibt das Eingangssignal für die Phasenreglerschleife (engl. Phased locked loop, PLL) aus. Die PLL erzeugt das externe Taktsignal für die ADC-Karte. Der Triggerausgang des vierten Kanals gibt das Startsignal für die Aufnahme eines TICO-Ramanspektrums aus. Die feste Phasenbeziehung der einzelnen Wellenformen ist hier von besonderer Bedeutung für die Synchronisation: Anhand der Position des ersten Samples mit Ramaninformation wird die Position jedes weiteren Samples mit Ramaninformation berechnet, sodass eine feste Phasenbeziehung zwischen den Laserquellen und der Detektionseinheit unabdingbar ist.

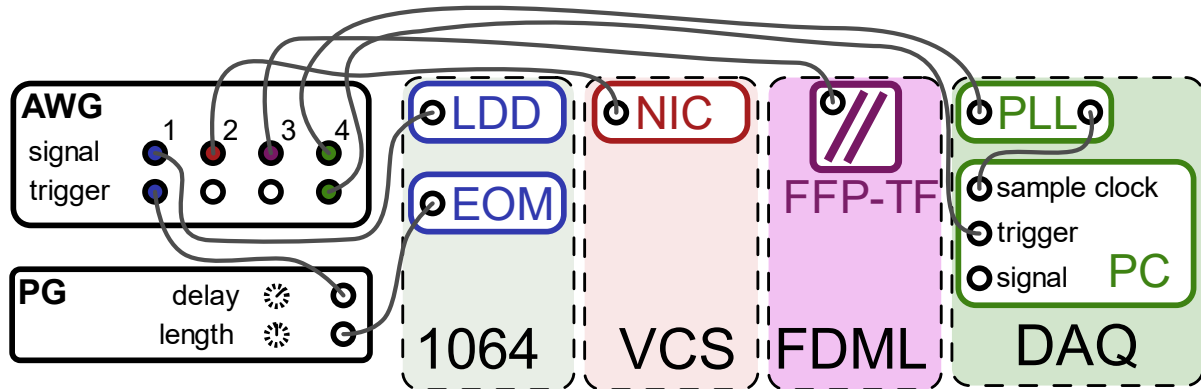


Abbildung 4-20 Schema des elektronischen Setups für die Synchronisation zwischen den Laserquellen und der Datenerfassung. Wellenzuggenerator (AWG) stellt vier phasenstarre Wellenformen mit einem zusätzlichen Trigger für jeden Kanal zur Verfügung. Erster Kanal des AWGs wird für die Vormodulation der 1064 nm Laserdiode genutzt. Triggerausgang des ersten Kanals dient als Eingangssignal für den Pulsgenerator (PG), der die kurzen Pulse für den EOM erzeugt. Kanal zwei stellt das externe Taktsignal für die NI-Karte (NIC) zur Verfügung, um eine Synchronisation der Voice-Coil-Stage (VCS) mit der Detektion zu gewährleisten. Der dritte Kanal stellt das Mastersignal dar und gibt das Treibersignal für den Fabry-Perot-Filter (FFP-TF) des FDML-Lasers aus. Kanal vier gibt das Eingangssignal für die Phasenreglerschleife (engl. phased locked loop, PLL) aus, um ein phasenstarrs externes Taktsignal für die ADC-Karte zu erzeugen. Der Triggerausgang von Kanal vier wird als Startsignal für die Aufnahme eines Ramanspektrums genutzt.

4.3.5.1 Wellenformen

Abbildung 4-21 zeigt die unterschiedlichen Wellenformen, die für die synchronisierte Aufnahme eines TICO-Ramanspektrums benötigt werden. Für jeden spektralen Punkt des TICO-Spektrums wird eine Periode des FDML-Lasers benötigt sowie eine weitere Periode zum digitalen Balancieren des letzten spektralen Punktes. Jede Periode der Wellenform für den FDML-Laser besteht aus 128 Datenpunkten. Ein spektraler Punkt jedes TICO-Spektrums wird während einer FDML-Periode aufgenommen. Die Anzahl von gewünschten spektralen Punkten gibt die Länge jeder Wellenform vor. Die maximale Taktfrequenz des AWG ist 100 MHz, wobei die Frequenz des AWG an die Resonanzfrequenz des FDML-Filters angepasst wird und abhängig vom verwendeten FDML-Laser ist. Zum Abtasten des Ramanspektrums wird nur der Vorwärts-Sweep des FDML genutzt, sodass 64 spektrale Punkte für ein Spektrum zur Verfügung stehen. Die Amplitude der FDML-Wellenform bestimmt den Abstimmbereich des FDML-Lasers. Die verwendeten FDML-Laser haben Frequenzen zwischen 400-420 kHz, sodass die Taktfrequenz des AWG zwischen 53-54 MHz liegt. Im einfachsten Fall, wie in Abbildung 4-21 dargestellt, wird die Position der Pulse in jeder neuen Periode des FDML-Lasers sukzessive erhöht. Wie im nächsten Abschnitt geschildert, können auch weitere Aufnahmekonzepte umgesetzt werden, um die Aufnahmezeit zu reduzieren. Die Wellenform für die PLL zum Erzeugen des externen Taktsignals der ADC-Karte liegt als TTL-Signal mit einem Abtastverhältnis von 50% vor. Abhängig vom verwendeten FDML-Laser variiert somit die Frequenz, was eine Anpassung des PLL-Faktors für die Erzeugung des

Taktsignals mit einer Frequenz von $\sim 1,56$ Gs bedingt. Der Trigger zum Start der Datenaufnahme wird für jedes Spektrum ausgegeben.

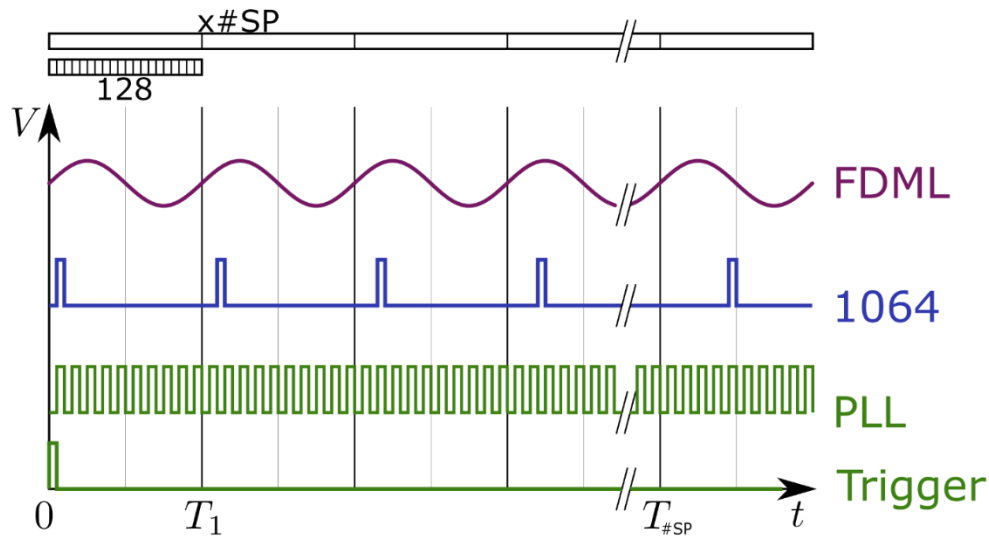


Abbildung 4-21 Wellenformen die im AWG für die Synchronisierung hinterlegt sind. Für jeden spektralen Punkt (SP) wird eine FDML-Periode benötigt, die aus 128 Samples besteht. Die 1064 nm Laserpulse des Pumpasers werden in jeder neuen FDML-Periode gegenüber dem Start des FDML verschoben. Alle Wellenformen sind phasenstarr zueinander und werden im Master-Slave-System ausgegeben. Der Master ist die FDML-Wellenform. Die Wellenform für die Phasenreglerschleife (PLL) hat ein Abtastverhältnis von 50%. Nach der PLL steht ein Signal mit 1.56 GHz als externes Taktsignal für die ADC-Karte zur Verfügung. Die Datenaufnahme jedes TICO-Spektrum wird durch die Trigger-Wellenform ausgelöst.

4.3.6 Zeitbasierte Wellenzahlberechnung

Für die Berechnung der Wellenzahlen eines TICO-Ramanspektrums müssen die Wellenlängen der beiden Laserquellen bekannt sein. Die Wellenlänge des Pumpasers ist fest und bedarf keiner genaueren Betrachtung. Die Wellenlänge des FDML-Lasers ändert sich periodisch und folgt der Bewegung des Fabry-Perot-Filters innerhalb des FDML-Lasers. Der Filter wird mit einem Sinus getrieben, sodass sich die Wellenlänge sinusförmig ändert. Daraus folgt, dass der FDML-Laser im Bereich der Umkehrpunkte seine Wellenlänge langsamer ändert als im übrigen Verlauf des Sinus. Mittels des OSA lassen sich die Zentralwellenlänge sowie der Abstimmbereich des FDML-Lasers messen, um den im Ramanspektrum abgedeckten Bereich und die FDML-Wellenlänge für jeden spektralen Punkt zu berechnen.

Für die Digitalisierung muss der Abstimmbereich des FDML-Lasers zeitlich aufgelöst und der Beginn einer FDML-Periode bekannt sein. Dies ist gewährleistet durch das externe phasenstarre Taktsignal für die ADC-Karte, das synchron zu den Wellenformen der beiden Laserquellen ist. Zwischen den einzelnen FDML-Perioden besteht somit ein festes Timing, das eine Zuweisung der einzelnen Wellenzahlen für das gesamte Ramanspektrum ermöglicht. Hierzu muss vorab der zeitliche Versatz aus FDML-Laser, Pumpaserpulsen und Detektion korrigiert werden. Vor der Messung wird ein Objektträger ohne Probe in den Probenhalter gespannt und die Filter zum Blocken des Pumplichts entfernt, sodass die Pumppulse

die balancierte Photodiode treffen. Die Ausgangsleistung ist entsprechend abgeschwächt. Die Position des ersten Pumpulses stellt die Verzögerung aus Beginn der Datenaufnahme und erstem Abtastwert mit Ramansignal dar. Jeder weitere Abtastwert mit Ramansignal der darauffolgenden spektralen Punkte lässt sich durch die Synchronisation errechnen. In Abhängigkeit der Position des ersten Pumpulses wird nun die Phase der Wellenform für den FDML-Laser angepasst, um den Start einer FDML-Periode und damit den Start des Wellenlängenabstimmbereichs zeitlich mit dem ersten Pump-Puls zu überlagern. Der Objektträger im Strahlengang sorgt für Interferenzen des FDML-Lichts. Der Phasensprung der an den Umkehrpunkten des FDML-Lasers entsteht und durch die roten Balken in Abbildung 4-22 gekennzeichnet ist, zeigt den Start eines Sweeps des FDML-Lasers an. Entsprechend zeigt der linke rote Balken sowohl die Position des ersten Pumpulses als auch den Start ein FW-Sweep des FDML-Lasers an und ist das erste Sample mit Ramaninformation der digitalisierten Roh-Daten.

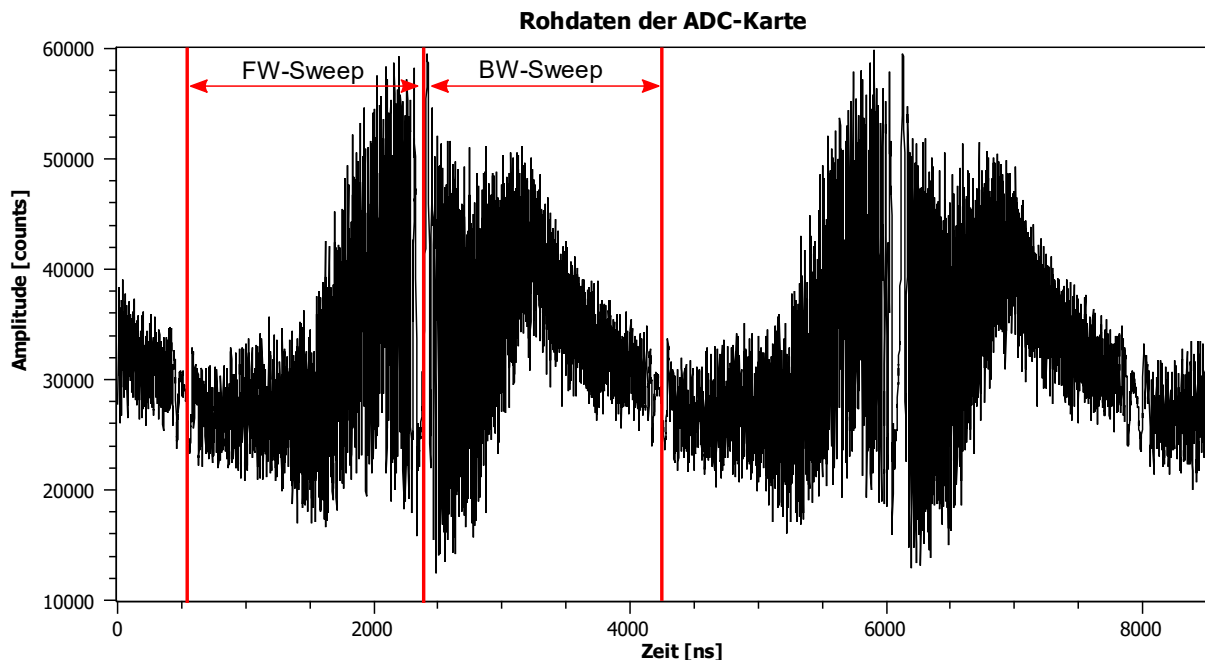


Abbildung 4-22 Rohdaten der ADC-Karte für das balancierte FDML-Licht. Die äußeren roten Balken schließen eine FDML-Periode ein, die sich in vorwärts (engl. forward, FW) und rückwärts (engl. backward, BW) Sweep aufteilen. Der linke rote Balken markiert das Datensample des ersten spektralen Punktes eines Ramanspektrums dar. Jeder weitere Punkt kann durch die Synchronisierung der Laserquellen und der Datenerfassung berechnet werden.

4.3.7 Sparse Sampling

Das TICO-Ramansystem kann durch seine Flexibilität mit einem zusätzlichen Aufnahmeconcept erweitert werden. Das Abtasten der einzelnen spektralen Punkte des Spektrums wird durch die Position der Pumppulse bestimmt, die frei programmierbar sind. Entsprechend lassen sich variable Aufnahmemuster umsetzen, ohne die Notwendigkeit, den gesamten durch die Laserquellen abgedeckten spektralen Bereich aufzunehmen.

Die Motivation für dieses Konzept ist durch die Ramanspektren selbst gegeben. Bestimmte Bereiche des Spektrums enthalten mehr Informationen und sind charakteristisch im Vergleich zu anderen spektralen Bereichen mit weniger oder keinen nützlichen Informationen. Bestimmte Ramananwendungen sind nicht abhängig von der Aufnahme ganzer Spektren, da der gewünschte chemische Kontrast durch das Signal weniger Ramanbanden umgesetzt werden kann. Es ist davon auszugehen, dass für einen Großteil der Ramananwendungen mit ca. 2-20 spektralen Punkten eine ausreichende Datenbasis gegeben ist, um auch komplexe Ramansignaturen aufzulösen und die gewünschte Kontrastierung des Gewebes zu erreichen. Dieses merkmalsgestützte Aufnahmeconcept wird als „Sparse Sampling“ bezeichnet und ist in Abbildung 4-23 dargestellt. Statt einer kontinuierlich zunehmenden Verzögerung des Pumpulses gegenüber dem Start des FDML-Sweeps, ist die Position der Pumppulse an die Charakteristika des Ramanspektrums angepasst, wie es die roten Punkte in Abbildung 4-23 beispielhaft kennzeichnen. Wesentlicher Vorteil neben der Flexibilität der Aufnahme ist die verkürzte Aufnahmezeit bei gleichzeitiger Erhaltung der Spezifität. Außerdem reduziert die kürzere Aufnahmezeit die Belastung der Probe durch die hohe Intensität des Pumplasers, was zu einer thermischen Schädigung des Gewebes führen kann.

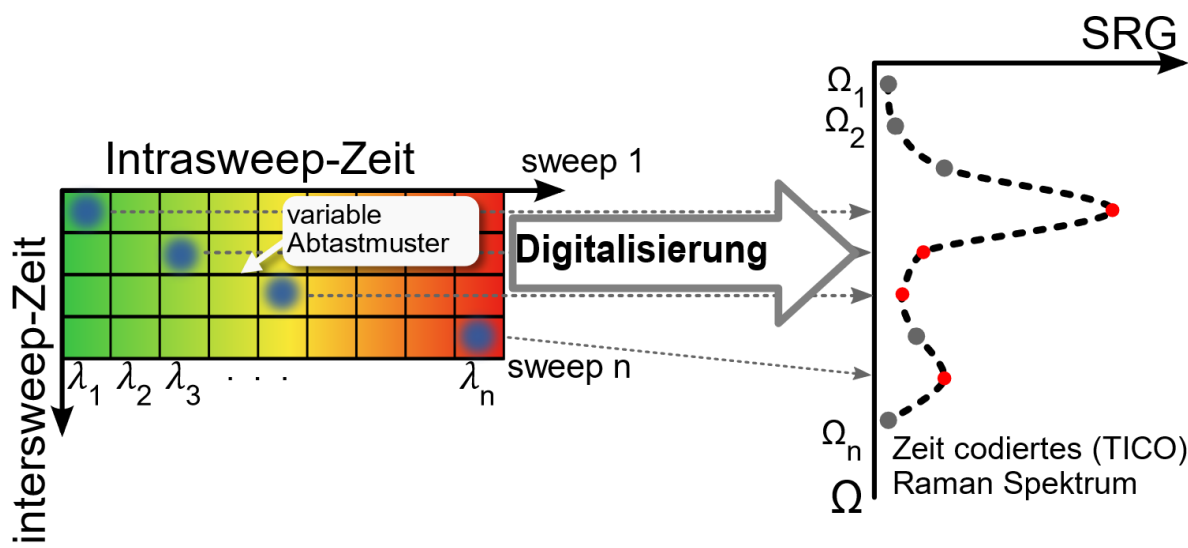


Abbildung 4-23 TICO-Konzept im Fall von Sparse-Sampling. Anstelle einer kontinuierlich zunehmenden Verzögerung der Pumppulse gegenüber dem Start des FDML-Sweeps sind beliebige Abtastmuster möglich, die sich auf die charakteristischsten Punkte eines Ramanspektrums fokussieren. Durch die synchronisierte, phasenstarre Detektion müssen lediglich die Positionen der Pumppulse in der 128 Sample langen FDML-Wellenform bekannt sein, um das Sample mit Ramaninformation aus dem komplett digitalisiertem FDML-Sweep zu berechnen.

Für die Umsetzung von Sparse-Sampling muss die Aufnahmesoftware und die verwendeten Wellenformen für die Laserquellen angepasst werden. Im Gegensatz zum bekannten Anstieg der Sampleposition muss im Fall von Sparse Sampling die Position der Pumpulse an die Aufnahmesoftware übergeben werden. Hierfür wurde die vorhandene Aufnahmesoftware in eine allgemeingültige Version abgeändert. Die dynamische Programmbibliothek (engl. dynamic link library, DLL) kann somit beliebigen Aufnahmemustern folgen. Die Änderungen der Aufnahmeparameter werden in der LabView basierten Steuerungs- und Messsoftware umgesetzt und an die DLL übergeben. Dies gewährleistet eine möglichst große Flexibilität, da die in C++ umgesetzte Software nicht fortlaufend angepasst werden muss und kleine Änderungen und Erweiterungen in LabView implementiert werden können.

Für die genutzten Wellenformen muss lediglich die Wellenform des Pumplasers angepasst werden. Hierbei muss die Position der Vormodulation sowie der Trigger für die Modulierung durch den EOM angepasst werden. Als Folge muss für jede Sparse Sampling Konfiguration ein eigenes Setup im AWG hinterlegt werden. Hierzu wurde ein separates LabView-Programm umgesetzt. Voraussetzung für die Implementierung sind die FDML-Parameter: Es wird die Zentralwellenlänge sowie der Abstimmbereich benötigt, um zu errechnen, welches Sample innerhalb des FDML-Sweeps der abzutastenden Wellenzahl entspricht. Ausgehend von den FDML-Parametern können maximal 64 spektrale Punkte gewählt werden. Die Wellenform wird entsprechend erstellt, wobei sichergestellt wird, dass zwei benachbarte spektrale Punkte nicht an derselben Position liegen, da die digitale Balancierung auf unterschiedliche Positionen des Samples mit Ramaninformation in aufeinander folgenden Sweeps angewiesen ist.

Das Sparse Sampling Konzept ist besonders nützlich, wenn bekannt ist, welche Wellenzahlen abgefragt werden müssen, um einen bestimmten Kontrast im Gewebe zu erzeugen. Wie bereits in Abschnitt 3.3.1.3 geschildert, sind besonders im Bereich der CH-Streckschwingungen um 2900 cm^{-1} einige wenige Ramanbanden von Interesse, die sich durch eine gezielte Messung mittels Sparse Samplings besonders eignen. Für unbekannte Ramansignaturen lässt sich vorab ein TICO-Ramanspektrum mit 64 spektralen Punkten aufnehmen. Abhängig vom gemessenen Ramanspektrum kann das Aufnahmemuster über Sparse Sampling angepasst werden, um die Aufnahmezeit zu verkürzen.

5 BILDGEBUNG: ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dieses Kapitel stellt die Ergebnisse der stimulierten TICO-Raman Mikroskopie dar und zeigt auf, dass sich das TICO-Raman Konzept von der Aufnahme von Phantomen als Machbarkeitsnachweis in ein vielversprechendes stimuliertes Ramansystem für die Mikroskopie von biologischem Gewebe entwickelt hat.

Für den Vergleich von unterschiedlichen Ramankonzepten bietet sich die Messung von Ramanphantomen an. Allen voran Polystyrol- (PS) und Polymethylmethacrylat-Kugeln (PMMA) werden genutzt, um die Leistung eines Ramansystems unabhängig von der gewählten Probe einzuschätzen. Auch als Referenzprobe für die Signaloptimierung wird im TICO-Raman System eine PMMA-Scheibe genutzt. Entsprechend beschreibt der erste Teil dieses Kapitels die Bildgebung von Ramanphantomen und ordnet die Leistungsfähigkeit des TICO-Raman-Konzepts ein. Ausgehend von den Referenzproben wird das Prinzip von Sparse Sampling TICO-Raman verdeutlicht und quantifiziert die Vorteile dieses Aufnahmekonzepts. Im Anschluss werden die Ergebnisse für biologische Proben präsentiert und diskutiert. Zuerst werden die Ergebnisse von prominenten Gewebetypen wie Haut- und Hirngewebe gezeigt. Abschließend wird auf Gewebe des Rachenraums eingegangen, wobei zwischen tumorösen und gesundem Gewebe unterschieden wird. Unterstützt werden die Ergebnisse der stimulierten TICO-Ramanmikroskopie durch spontane Ramanspektren desselben Gewebetyps, um einerseits die Ergebnisse zu bestätigen und andererseits einen Ausblick für zukünftige TICO-Raman Anwendungen zu geben.

5.1 SIGNALOPTIMIERUNG UND REFERENZPROBEN

5.1.1 Signaloptimierung mithilfe des Ramansignals einer PMMA-Scheibe

Die Signaloptimierung mithilfe einer PMMA-Scheibe hat zwei Gründe: Erstens wird der Strahlüberlapp, wie im Abschnitt 4.3.1 bereits beschrieben, mithilfe des Ramansignals weiter optimiert. Der zuvor über die Kamera eingestellte Strahlüberlapp führt nicht zwangsläufig zum höchsten Ramansignal. Es hat sich jedoch gezeigt, dass der über die Kamera eingestellte Strahlüberlapp immer zu einem Ramansignal führt, sodass von diesem initialen Raman-Signal das Optimum gefunden werden kann. Zweitens wird eine genaue Wellenzahlzuweisung gewährleistet. Durch den bekannten spektralen Verlauf von PMMA kann die Phase des FDML-Lasers angepasst werden, um eine exakte Wellenzahlzuweisung für die Ramanbanden zu gewährleisten. Da das Raman Spektrum von PMMA nicht spiegelsymmetrisch ist, kann auf die Abstimmrichtung des FDML-Lasers geschlossen werden. Auch die Höhe des Ramansignals bei 2954 cm^{-1} gibt eine Auskunft, wie gut das System justiert ist, was einen wesentlichen Einfluss auf die Mikroskopie-Anwendungen hat. In Abbildung 5-1 ist das TICO-Raman Spektrum einer PMMA-Scheibe dargestellt. Das Spektrum ist 1000-fach gemittelt und wurde mit einer FDML-Leistung von 6,4 mW aufgenommen. Die Spitzen-Pumpleistung auf der Probe beträgt 2,45 kW und entspricht der

aktuell maximal verfügbaren Laserleistung. Das maximale Ramansignal liegt bei 2954 cm^{-1} und bestätigt die korrekt eingestellte Phase des FDML-Lasers für die Wellenzahlberechnung. Das Signal von 60 mV entspricht einem SRG von $3,8 \cdot 10^{-3}$.

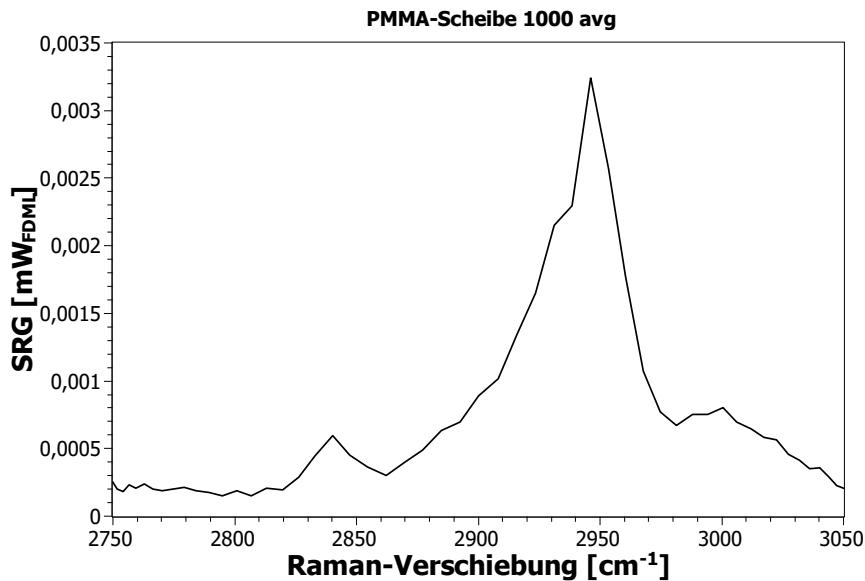


Abbildung 5-1 Ramanspektrum von PMMA aufgenommen im spektralen Fenster von $2750\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ mit 64 spektralen Punkten. Das Spektrum wurde 1000-fach gemittelt und mit einer Spitzenleistung des Pumplaser von $2,45\text{ kW}$ und $6,4\text{ mW}$ optischer Leistung des FDML-Lasers aufgenommen. Das Spektrum zeigt die korrekte Wellenzahlzuweisung mit maximalen Ramansignal bei 2954 cm^{-1} , was zu einem SRG von $3,8 \cdot 10^{-3}$ führt.

5.1.2 Schmale Ramanbanden im Fingerprintbereich

Neben der Aufnahme im CH-Streckbereich wurde die TICO-Raman Spektroskopie im Fingerprintbereich angewendet. Im Fingerprintbereich existieren eine Vielzahl von spektral schmalen Ramanbanden, sodass die spektrale Auflösung ein wichtiger Parameter für SRS-Anwendungen im Fingerprintbereich ist. Entsprechend wurde für die Untersuchung der spektralen Auflösung des Systems ein Reinstoff mit schmalen Ramanbanden gesucht. In Abbildung 5-2 sind zwei Ramanspektren der Chemikalie Benzonnitril im spektralen Fenster von $1590\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ dargestellt. Für die spektrale Abdeckung von 20 cm^{-1} wurde der Abstimmbereich des FDML Lasers auf $\sim 3,7\text{ nm}$ um die Zentralwellenlänge von 1281 nm reduziert. Das TICO-Raman Spektrum in Rot dargestellt, ist 1000-fach gemittelt und wurde mit einer FDML-Laser Leistung von $7,2\text{ mW}$ und $1,6\text{ kW}$ Pulsspitzenleistung des Pumplasers aufgenommen. Die Gesamtintegrationszeit betrug 152 ms . Das spontane Ramanspektrum in Schwarz aufgetragen, wurde mit 10 mW auf der Probe bei 532 nm angeregt. Es wurden für optimale Ergebnisse drei Aufnahmen mit je 5 s gemittelt. Das genutzte optische Gitter hat 2400 l/mm . Für die Angabe der Halbwertsbreite für die spektrale Auflösung wurden beide Spektren linear interpoliert. Die schwarze horizontale Linie zeigt die gewählte Nulllinie des TICO-Raman Spektrums, woraus sich eine Halbwertsbreite von $4,1\text{ cm}^{-1}$ ergibt. Die Halbwertsbreite des spontanen Spektrums ist $4,8\text{ cm}^{-1}$ und somit geringfügig breiter als das TICO-Raman Spektrum. Der spektrale Verlauf des TICO-Ramanspektrums zeigt leichte Abweichungen zum spontanen Spektrum. Eine

spektrale Auflösung kleiner als 20 cm^{-1} wird als ausreichend für Ramanbanden in biologischen Proben angesehen [40].

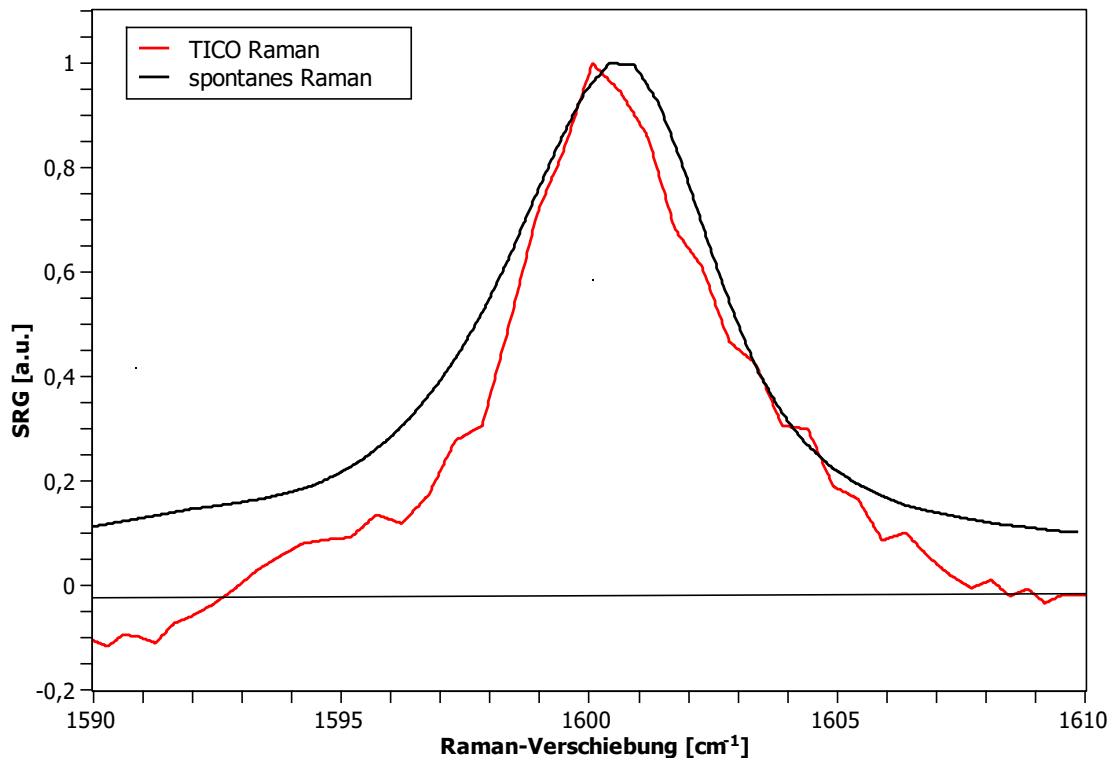


Abbildung 5-2 TICO-Raman Spektrum (rot) und ein spontanes Ramanspektrum (schwarz) von Benzonitril im spektralen Fenster von $1590\text{-}1610 \text{ cm}^{-1}$. Das TICO-Raman Spektrum ist mit 64 spektralen Punkten aufgenommen und 1000-fach gemittelt, mit einer Gesamtintegrationszeit von 152 ms. Die Gesamtintegrationszeit des spontanen Ramanspektrums beträgt 15 s. Für die Berechnung der Halbwertsbreite wurden beide Spektren linear interpoliert. Die schwarze horizontale Linie repräsentiert die gewählte Nulllinie des TICO-Raman Spektrum, was zu einer Halbwertsbreite von $4,1 \text{ cm}^{-1}$ führt. Das spontane Spektrum hat eine Halbwertsbreite von $4,8 \text{ cm}^{-1}$. Das TICO-Raman Spektrum zeigt leichte Abweichungen des spektralen Verlaufs gegenüber dem spontanen Ramanspektrum

5.1.3 Ramanmikroskopie von PS- und PMMA-Kugeln

Neben der Überprüfung der Justage anhand des Ramanspektrums von PMMA, werden PMMA und Polystyrol (PS) Kugeln mit einem Durchmesser von $20 \mu\text{m}$ im spektralen Bereich der CH-Streckschwingung zwischen ca. $2800\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ aufgenommen, um das TICO-Raman System weiter zu charakterisieren. Hierfür wird der FDML-Laser mit einer Zentralwellenlänge von 1550 nm genutzt. Die Kugeln werden händisch mit Ultraschallgel gemischt, auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Gegen Austrocknung wird der Objektträger mit Nagellack abgedichtet. Neben dem SNR, dem spektralen Verlauf und der Signalhöhe können Verzerrungen des Bildfelds beurteilt werden. Abbildung 5-3 zeigt die TICO-Raman Spektren von PMMA und Polystyrol. Das Spektrum wurde mit 64 spektralen Punkten aufgenommen und ist 9-fach gemittelt, was zu einer Aufnahmezeit von $1,4 \text{ ms}$ für ein TICO-Raman Spektrum führt. Klar zu erkennen ist, dass sich beide Spezies durch ihr Ramanspektrum voneinander unterscheiden. Die Ramansignale bei 2954 cm^{-1} für PMMA und

3060 cm^{-1} für PS sind ausreichend, um einen Ramankontrast zu erzeugen. Die Signalhöhe von 30 mV bei einer FDML-Laserleistung von 4,3 mW und einer Spitzenleistung der Pumpulse von 1,6 kW, erlaubt eine direkte Kontrastierung aus den Rohdaten, ohne dass es einer komplexen Datenprozessierung bedarf. Das SRG für das maximale Raman-Signal von 30 mV beträgt für beide Spezies $2,2 \cdot 10^{-3}$.

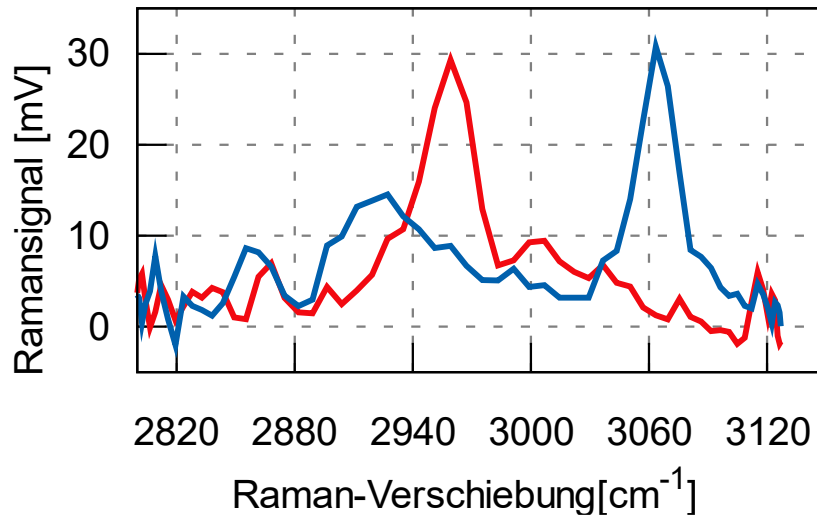


Abbildung 5-3 Ramanspektrum von PMMA (rot) und PS (blau) aufgenommen im spektralen Fenster von 2820-3120 cm^{-1} mit 64 spektralen Punkten. Das Spektrum wurde 9-fach gemittelt und mit 1,6 kW Spitzenleistung der Pumpulse und 4,3 mW Probenlicht aufgenommen. Für PMMA liegt das maximale Ramansignal bei 2954 cm^{-1} , für PS bei 3065 cm^{-1} . Beide Ramanbanden haben ein maximales Signal von ~ 30 mV.

Von den TICO-Raman Spektren aus Abbildung 5-3 ausgehend sind ganze Bilder mit denselben Parametern aufgenommen worden. Dargestellt in Abbildung 5-4 ist links ein $512 \times 512\ \mu\text{m}$ großes Sichtfeld mit 256×256 Pixeln. Es sind keine Verzeichnungen der Kugeln durch nichtlineares Verhalten des Linearschlittens der y-Achse sowie der VCS der x-Achse zu erkennen. Die Aufnahme erfolgte unidirektional und benötigte, berechnet über die Pixel-Aufnahmezeit, ~ 92 Sekunden. Die gelbe Linie gibt die Position des Linienprofils rechts an. Rot stellt PMMA dar, blau PS. Die Intensität von ~ 200 beider Spezies im Linienprofil ist nicht in Millivolt gegeben. Es beschreibt die Signalintensität im Wertebereich von 0-255, wobei die maximale Intensität von 255 einem Ramansignal von 30 mV entspricht, wie im Spektrum von Abbildung 5-3 für PMMA und PS dargestellt. Das SNR beträgt 14 für PMMA und 17,7 für PS und wird aus dem maximalen Signal und der Standardabweichung zwischen 40-90 μm im Linienprofil aus Abbildung 5-4 berechnet. Das gesamte TICO-Raman Spektrum besteht aus 64 spektralen Punkten. Für die spektrale Trennung der Kanäle wurden lediglich die spektralen Punkte 32 und 45 genutzt, sodass die Aufnahme der übrigen spektralen Punkte nicht nötig ist, um zwischen PS und PMMA zu unterscheiden. Von der Ramananwendung abhängig, ist die gezielte Aufnahme weniger spektraler Punkte gegenüber der Aufnahme ganzer Spektren vorteilhaft, was das Sparse Sampling Konzept beschreibt, dessen Ergebnisse im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

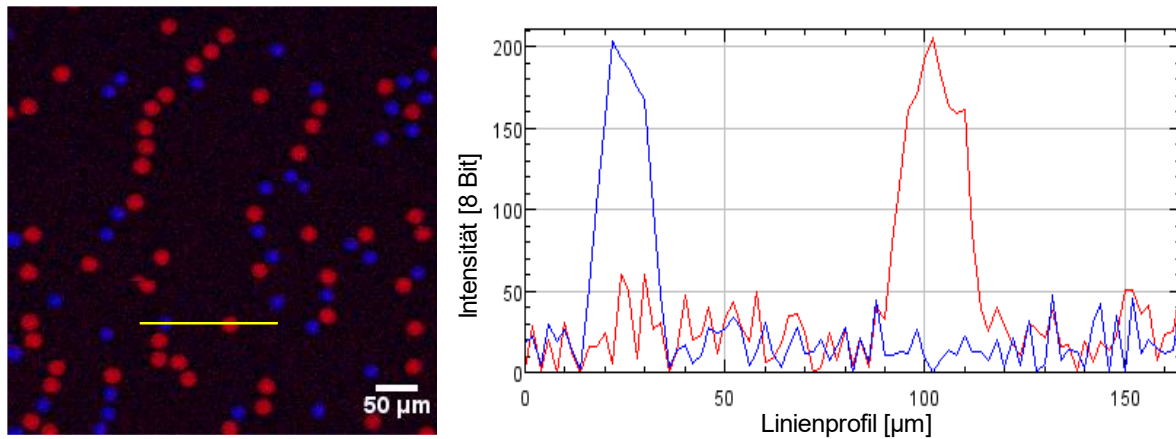


Abbildung 5-4 Links: TICO-Raman Aufnahme von PMMA- (rot) und PS-Kugeln (blau) mit 64 spektralen Punkten, 4,3mW Abtastlicht und 1,6 kW Spitzenleistung des Pumplichts. Für die spektrale Trennung wurden zwei spektrale Punkte (SP) genutzt: SP 35 (2954 cm^{-1}) für PMMA, SP42 (3055 cm^{-1}) für PS. Das FOV beträgt $512 \times 512\text{ }\mu\text{m}$ mit 256×256 Pixel. Die gelbe Linie kennzeichnet das Linienprofil rechts. Die Intensität von ~ 200 für beide Spezies ist nicht die Signalhöhe in Millivolt, sondern beschreibt das Signal im Wertebereich von 0-255 (8-Bit), wobei die obere Grenze für die Darstellung bei 30 mV gesetzt wurde, ausgehend von der Signalhöhe aus Abbildung 5-3. Das SNR für PS ist 17,7 und für PMMA 14 und wurde aus dem maximalen Signal geteilt durch die Standardabweichung zwischen Mikrometer 40-90 μm des Linienprofils berechnet.

5.1.4 Merkmalsorientierte Abtastung für die Ramanmikroskopie

Die Umsetzung des Sparse Sampling Konzepts wird durch die Aufnahme von PS- und PMMA-Kugeln eingeführt und beurteilt. Hierfür werden um das maximale Ramansignal von PS und PMMA die spektralen Punkte äquidistant verteilt. Abbildung 5-5 zeigt die Verteilung der spektralen Punkte für die Aufnahme von 6 spektralen Punkten für das zuvor aufgenommene Spektrum von PS und PMMA aus Abbildung 5-3. Drei spektrale Punkte je Spezies erlauben es, neben dem Signalmaximum die ansteigende und absteigende Flanke der Ramanbande zu vermessen. Würde nur ein spektraler Punkt je Bande genutzt, wäre eine Beurteilung, ob der spektrale Punkt auch das maximale Ramansignal misst, nicht gewährleistet. Die Flexibilität, eine beliebige Anzahl von spektralen Punkten zu verteilen, erlaubt es auf die jeweilige Ramananwendung zugeschnittene Aufnahmemuster zu entwerfen. Weniger, aber merkmalsorientiert platzierte Messpunkte im Ramanspektrum erlauben es, im Vergleich zur Aufnahme ganzer Spektren für bestimmte Anwendungen einen identischen Ramankontrast zu erzeugen.

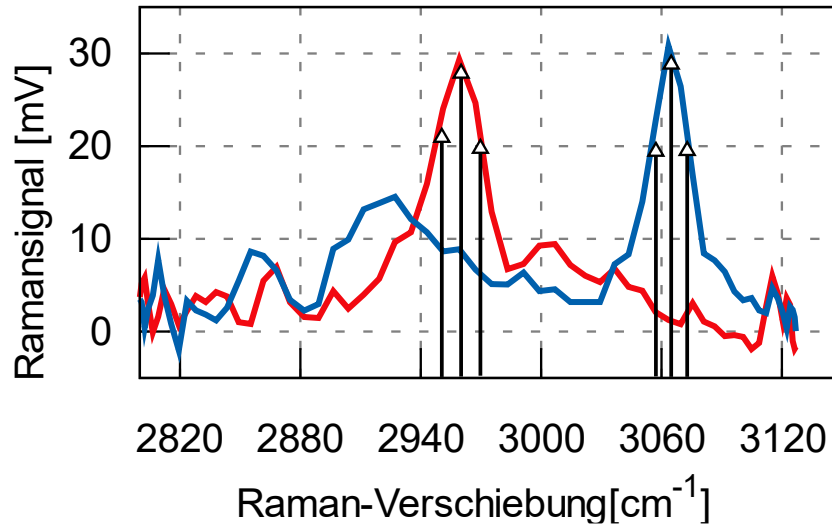


Abbildung 5-5 Ramanspektrum von PMMA (rot) und PS (blau) im spektralen Fenster von 2800-3120 cm^{-1} aufgenommen mit 64 spektralen Punkten. Die 6 Pfeile zeigen die spektralen Punkte der Sparse Sampling Konfiguration für die spektrale Trennung von PMMA und PS. Eine höhere Anzahl spektraler Punkte ist durch die Charakteristik der beiden Ramanspektren nicht nötig.

Für die Demonstration von Sparse Sampling wird dasselbe Sichtfeld wie in Abbildung 5-4 mit 6 spektralen Punkten aufgenommen und ist in Abbildung 5-6 dargestellt. Dieselben Laserparameter wurden für eine optimale Vergleichbarkeit genutzt. Klar zu erkennen sind die Bildverzerrungen am linken Bildrand, durch die hohe Beschleunigung zum Erreichen der Scangeschwindigkeit. Leichte Bildverzerrungen sind auch in der Bildmitte zu erkennen. Unabhängig von den Bildartefakten lassen sich die PMMA- und PS-Kugeln mit 6 spektralen Punkten unterscheiden. Durch die verringerte Anzahl spektraler Punkte sinkt die Pixelaufnahmezeit im Vergleich zur Aufnahme mit 64 spektralen Punkten, um den Faktor 9,3 auf 151 μs . Die gelbe Linie kennzeichnet das Linienprofil rechts. Hier ist die maximale Signalintensität für PS ~ 220 und für PMMA 212, wobei sich der Wertebereich wie zuvor von 0-255 erstreckt und das Maximum von 255 dem Ramansignal von 30 mV entspricht. Wie zuvor wird das SNR aus dem Signalmaximum und der Standardabweichung im Linienprofil zwischen 40-90 μm berechnet und beträgt für PMMA 27 und für PS 24.

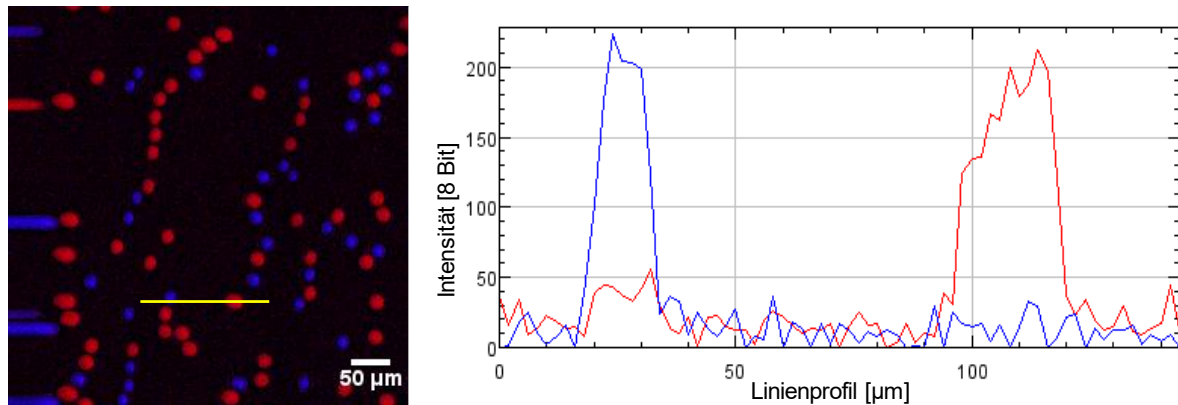


Abbildung 5-6 TICO-Raman Aufnahme von PMMA-(rot) und PS-Kugeln desselben FOV wie in Abbildung 5-4 (512x512 µm, 256x256 Pixel) aufgenommen mit 6 spektralen Punkten und gleichen Laserparametern. Durch die hohen Scangeschwindigkeiten sind Bildverzerrungen am linken Bildrand zu erkennen. Leichte Verzerrungen sind auch in der Bildmitte zu sehen. Die Pixelaufnahmezeit beträgt 151 µs und ist 9,3 schneller im Vergleich zu der Aufnahme mit 64 spektralen Punkten. Die gelbe Linie kennzeichnet das Linienprofil, welches rechts dargestellt ist. Die maximale Intensität liegt für beide Spezies bei 210 im Wertebereich von 0-255, dessen Maximum bei 255 durch die 30 mV Signalhöhe aus Abbildung 5-3 gegeben ist. Das SNR beträgt für PS 24 und für PMMA 27 und wird aus der Standardabweichung des Linienprofils zwischen 40-90 µm und dem maximalen Signal berechnet.

Sparse Sampling hat gezeigt, dass für bestimmte Ramananwendungen die Anzahl spektraler Punkte nicht ausschlaggebend ist für die Bildqualität und den Ramankontrast. Von der Anzahl spektraler Punkte unabhängig, ist die Anzahl der gemittelten Aufnahmen entscheidend für die Bildqualität. Das SNR skaliert mit $\sqrt{\# \text{Aufnahmen}}$. Reduziert man die Anzahl gemittelter Aufnahmen sinkt das SNR, doch die Aufnahmegeschwindigkeit steigt. In Abbildung 5-7 ist die zweifach gemittelte Aufnahme von PS- und PMMA-Kugeln mit 6 spektralen Punkten dargestellt. Die Pixelaufnahmezeit reduziert sich auf 33,5 µs. Klar zu erkennen ist, dass sich die beiden Spezies klar unterscheiden lassen, was im Vergleich zur Aufnahme mit 64 spektralen Punkten und 9 Mittelungen zu einer ~42-fach schnelleren Aufnahme führt. Die Aufnahme der Daten erfolgte bidirektional, wobei für die Ansteuerung der VCS ein Sinus genutzt wurde. In den ersten Zeilen der Aufnahme ist zu sehen, dass die interne Regelung der VCS einige Zeit benötigt, um sich auf die hohe Scangeschwindigkeit einzustellen. Weitere Bildartefakte wie Verzerrungen der Kugeln sind zu erkennen. Die Aufnahme der Daten erfolgte nur im „linearen“ Bereich der sinusförmigen Bewegung außerhalb der Umkehrpunkte, um weitere Bildverzerrungen durch die langsamere Bewegung im Bereich der Umkehrpunkte des Sinus zu vermeiden. Die hohe Scangeschwindigkeit bedingt eine Reduzierung des FOV, da die VCS mit einer Maximalfrequenz von 10 Hz für den kompletten Verfahrensweg von $\pm 2,5$ cm spezifiziert ist. Als Folge konnte nur ein Bereich von 128x128 µm mit 256x256 Pixeln abgetastet werden. Wie zuvor gibt die gelbe Linie im Bild die Position des Linienprofils rechts an. Vergleicht man die Linienprofile aus Abbildung 5-6 und Abbildung 5-5 mit dem Linienprofil aus Abbildung 5-7, fällt das höhere Rauschen durch die geringe Anzahl von Mittelungen auf. Für PS liegt ein maximales Signal von 114 und für PMMA von 106 vor. Die Standardabweichung wird im Bereich von 65-85 µm des Linienprofils berechnet, was zu einem SNR

von 6,5 für PS und 11,9 für PMMA führt. Die Abnahme des SNR folgt nicht dem erwarteten Wert bei der Reduzierung der gemittelten Aufnahmen: Das Signal vom PMMA folgt nahezu der erwarteten Abnahme des SNR von $\frac{\sqrt{9}}{\sqrt{2}} = 2,14$ und nimmt von 27 auf 11,9 ab, was einem Faktor von 2,26 entspricht. Theoretisch würde für PS ein SNR von 11,2 erwartet. Tatsächlich nimmt das SNR um den Faktor 3,69 auf 6,5 ab und ist daher schlechter als der theoretische Wert. Da für alle Aufnahmen dieselben Laserleistungen genutzt wurden, kann die Abnahme des SNR für PS durch eine nicht perfekte Balancierung des FDML-Lasers für den Wellenlängenbereich von PS gegeben sein. Unabhängig von der Ursache wird durch Sparse Sampling eine Pixelaufnahmezeit im Mikrosekundenbereich ermöglicht. Abschließend soll verdeutlicht werden, dass die Laserparameter einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Daten haben. Leistungsänderungen des Pumplichts würden zu einer einheitlichen Abnahme des Ramansignals, durch die lineare Abhängigkeit von der Pumplicht-Intensität führen. Änderungen der Intensität des FDML-Lasers würden mit $\sqrt{I_{\text{FDML}}}$ skalieren. Änderungen des FDML-Lasers oder Imperfektionen der Balancierung haben einen Einfluss mit spektraler Abhängigkeit, welche das Ramanspektrum verfälschen können, was besonders für Proben mit einer unbekanntem Ramansignatur problematisch ist. Eine gleichbleibende Abnahme der Signalhöhe durch weniger Laserleistung würde lediglich zu längeren Integrationszeiten führen.

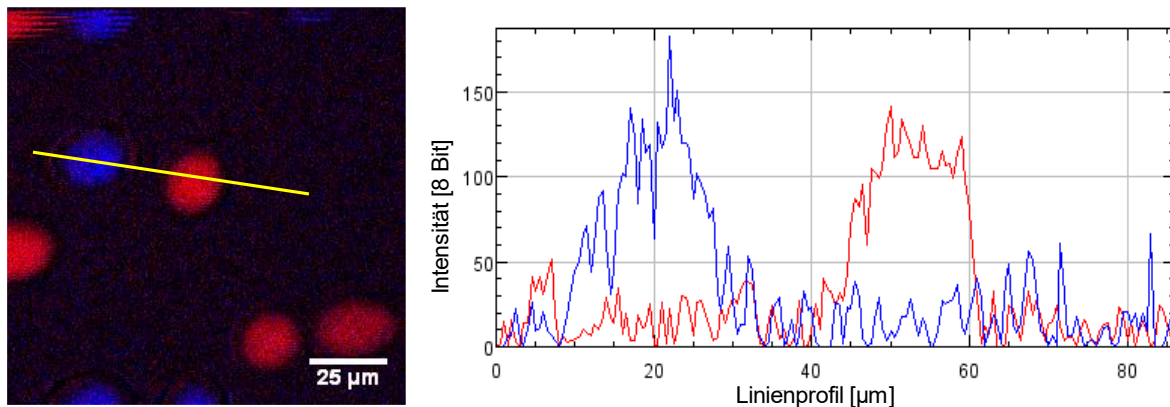


Abbildung 5-7 TICO-Raman Aufnahme von PMMA-(rot) und PS-Kugeln (blau) mit 6 spektralen Punkten. Die Daten sind zweifach gemittelt, was zu einer Pixelaufnahmezeit von $33,5 \mu\text{s}$ führt. Für die kurze Pixelaufnahmezeit wird die Probe bidirektional abgefahren, wobei nur im nahezu linearen Bereich der sinusförmigen Bewegung aufgenommen wird. Die gelbe Linie kennzeichnet das Linienprofil rechts. Für PMMA wird ein SNR von 11,9 und für PS ein SNR von 6,5 erreicht.

5.2 RAMANMIKROSKOPIE AN BIOLOGISCHEM GEWEBE

Das folgende Kapitel stellt die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit dar und befasst sich mit den Ergebnissen der TICO-Raman Mikroskopie an biologischen Proben. Es wurden unterschiedliche Gewebeklassen untersucht, wobei neben Hirngewebe eines Hausschweins, humane Gewebeprobeen erstmalig mikroskopiert wurden. Hierbei handelt es sich um Haut, gesundes Gewebe der Nasenmuschel sowie tumoröses Gewebe der Hypopharynx.

Neben der Auswertung der TICO-Raman Daten wurden spontane Ramanspektren aufgenommen und mit den TICO-Raman Daten verglichen. Einerseits um die spektrale Signatur zu vergleichen, andererseits um einen Ausblick auf zukünftige TICO-Raman Anwendungen zu geben. Für das Nasenmuschel- und Hypopharynxgewebe wurden zusätzlich TICO-Raman Aufnahmen im Fingerprintbereich durchgeführt. Ausblickend für zukünftige Forschungsarbeiten wurden erstmalig multivariate Analysemethoden, wie die Hauptkomponentenanalyse (engl. principal component analysis, PCA) angewendet und mit den TICO-Raman Daten verglichen.

5.2.1 Humane Haut

Haut ist durch ihren hohen Lipidanteil, der besonders in der Subkutis ein hohes Ramansignal gibt, eine prominente Probe für Ramananwendungen. Wie in Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben, ist die große Anzahl von CH_2 -Molekülgruppen mit den Raman aktiven Streckschwingungen im Bereich von $2800\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ für das hohe Ramansignal verantwortlich. Als Folge ist eine hohe Bildgebungsgeschwindigkeit möglich, was die häufige Verwendung von Hautgewebe in der Forschungscommunity erklärt. Die Messung an humaner Haut stellt die Translation des TICO-Raman Systems in den Kontext biomedizinischer Anwendungen dar. Die Proben wurden aus dem herausgeschnittenen Gewebe eines Face-Liftings gewonnen. Gefrierschnitte mit einer Stärke von $20\text{ }\mu\text{m}$ wurden vom Institut für experimentelle Dermatologie zur Verfügung gestellt und durch die lokale Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Genehmigungsnummer 16-278).

5.2.1.1 TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich

Für die Aufnahme unbekannter Proben wird im ersten Schritt die Aufnahme mit 64 spektralen Punkten umgesetzt, um einen Eindruck über die Ramansignatur der Probe zu erhalten. Für humane Haut ist dies in Abbildung 5-8 dargestellt. Aufgenommen wurde ein lipidreicher Gewebeteil der Haut. Das 500x500 μm große FOV wurde mit 250x250 Pixeln abgetastet und ist 20-fach gemittelt. Hieraus ergibt sich eine Pixelaufnahmezeit von 3,1 ms. Die Leistung des FDML-Lasers betrug 5,2 mW und die Spitzenleistung der Pumppulse betrug 1,6 kW. Zum Einfärben wurde die Lookup-Tabelle (LUT) „Fire“ von ImageJ genutzt. Die Intensität entspricht dem Ramansignal bei 2850 cm^{-1} . Das dargestellte Spektrum wurde über die 10x10 Pixel große ROI gemittelt, die als schwarzes Quadrat gekennzeichnet ist. Somit ist das dargestellte Spektrum insgesamt 200-fach gemittelt, was einer Aufnahmezeit von ~ 312 ms entspricht.

Das höchste Ramansignal von 28,4 mV ist für die CH_2 -Streckschwingung bei 2853 cm^{-1} gegeben und entspricht einem SRG von $1,7 \cdot 10^{-3}$. Wie im Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben, gibt es eine Vielzahl von Schwingungsmoden in diesem Bereich, sodass die einzelnen Ramanmoden nicht scharf begrenzt sind, sondern sich über 100 cm^{-1} von 2850-2950 cm^{-1} erstrecken. Das Signal bei 2930 cm^{-1} entspricht der Methylgruppe (CH_3), für das Ramansignal bei 3010 cm^{-1} ist die $=\text{C-H}$ Molekülbindung verantwortlich.

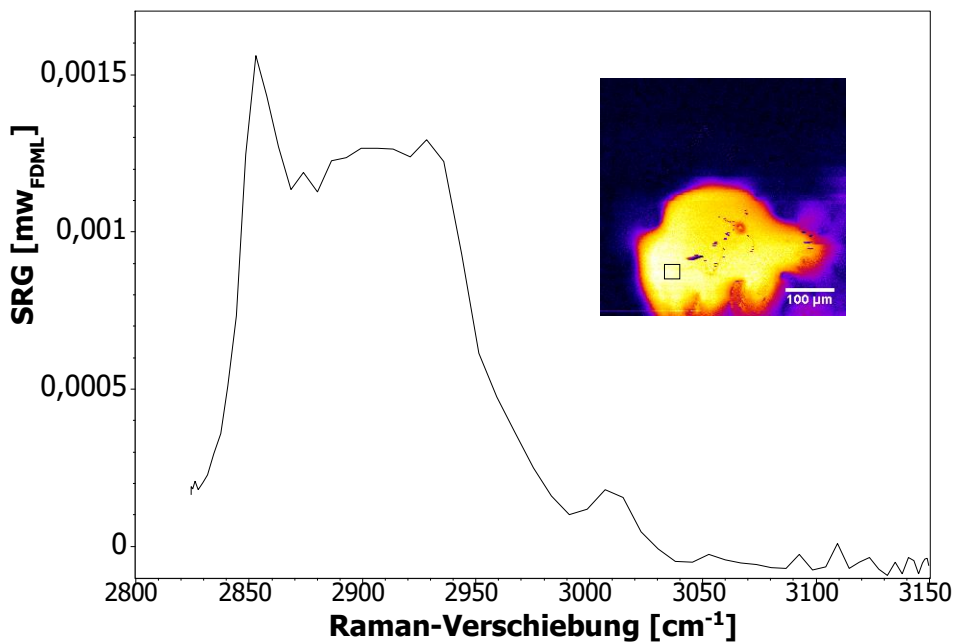


Abbildung 5-8 TICO-Ramanspektrum mit 64 spektralen Punkten im Wellenzahlbereich von 2820-3150 cm^{-1} zeigt die Raman aktiven Moden der Methyl- (CH_2) und Methylengruppe (CH_3) von 2850-2930 cm^{-1} . Für das Spektrum wurde eine Lipidansammlung in humaner Haut aufgenommen und 20-fach gemittelt. Die Farbdarstellung entspricht dem Ramansignal bei 2850 cm^{-1} (FIRE-LUT, ImageJ). Das Spektrum wurde über die 10x10 Pixel große ROI gemittelt und ist somit insgesamt 200-fach gemittelt, was zu einer Aufnahmezeit von ~ 312 ms führt. Bei 3010 cm^{-1} ist das Ramansignal der $=\text{C-H}$ Molekülbindung zu sehen. Die Laserleistung des Pumplasers betrug 1,6 kW mit 5,2 mW Leistung des FDML-Lasers, was zu einem SRG von $1,7 \cdot 10^{-3}$ führt.

Für die Unterscheidung von Lipiden und Proteinen wird das Signal bei 2850 cm^{-1} mit dem Signal bei 2930 cm^{-1} verglichen. Außerhalb dieser beiden spektralen Bereiche werden keine Ramaninformationen gebraucht, um den Lipid-Protein-Kontrast im Gewebe zu erzeugen. Daraus folgend, wird für die Aufnahme humaner Haut im CH-Streckbereich Sparse Sampling genutzt. Das System wird auf die Verwendung 6 spektraler Punkte programmiert, mit 3 spektralen Punkten für die Ramanbande der CH_2 -Molekülbindung bei 2850 cm^{-1} und 3 spektralen Punkten für die CH_3 -Molekülbindung um 2930 cm^{-1} . Dargestellt in Abbildung 5-9 ist die TICO-Raman Aufnahme mit einem FOV von $2000 \times 2000\text{ }\mu\text{m}$ und 1000×1000 Pixeln. Durch das hohe Ramansignal bei der Messung mit 64 spektralen Punkten und 20-fach gemittelten Daten, wurden dieselben Parameter übernommen. Die Pfeile im überlagerten Spektrum geben die Position der genutzten spektralen Punkte an. Für jeden der zwei Kanäle sind zwei spektrale Punkte gemittelt. Der Kontrast zeigt lipidhaltiges Gewebe in Rot, der mehrheitlich durch Lipidtröpfchen gegeben ist. Der grüne Kanal stellt proteinreichere Strukturen, wie die intrazelluläre Matrix und Collagen dar. Die Intensität des roten Kanals folgt direkt der Höhe des Ramansignals bei 2850 cm^{-1} . Für die Darstellung des grünen Kanals wird die Differenz aus $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ gebildet. Anschließend wird der Schwellwert angepasst, sodass lediglich die proteinreichen Strukturen verbleiben. Diese Methode folgt direkt der Publikation von Freudiger et al. [60], die für lipidreiches Hirngewebe eine Abgrenzung der proteinreicheren Zellkerne mithilfe der Ramaninformation der CH_2 - und CH_3 -Molekülbindung bilden.

Die Pixelaufnahmezeit beträgt $335\text{ }\mu\text{s}$, was zu einer Gesamtaufnahmezeit von 5,6 Minuten führt. Im Vergleich zur Aufnahme mit 64 spektralen Punkten wurde die Aufnahmezeit um den Faktor 9,3 verkürzt und zeigt die Leistungsfähigkeit von Sparse Sampling für die merkmalsorientierte TICO-Ramanmikroskopie. Das SNR von 8,2 wurde aus einem Linienprofil der Rohdaten ohne die Mittelung von spektralen Punkten errechnet. Hierbei wurde die Standardabweichung des Ramansignals außerhalb eines Lipidtropfens und das über einen Lipidtropfen gemittelte Ramansignal bei 2850 cm^{-1} genutzt. Die verwendeten Laserleistungen von 1,6 kW für die Pumpulse und 4,9 mW für den FDML-Laser führen zu einem SRG von $7,94 \cdot 10^{-4}$. Das SRG für die Messung mittels Sparse Samplings im Vergleich zum Hautreferenzspektrum aus Abbildung 5-8 ist nur halb so hoch.

Das große FOV zeigt die Vorteile beim Verfahren der Probe, da ein nachträgliches Zusammenfügen der einzelnen Bildfelder zum Erzeugen eines großen Übersichtsmosaiks entfällt, wie es üblicherweise in Laser-Scanning-Mikroskopen implementiert ist. Nachteilig ist im Vergleich zu Systemen, die den Laserstrahl ablenken, die Geschwindigkeit, mit der eine Position in der Probe angefahren werden kann.

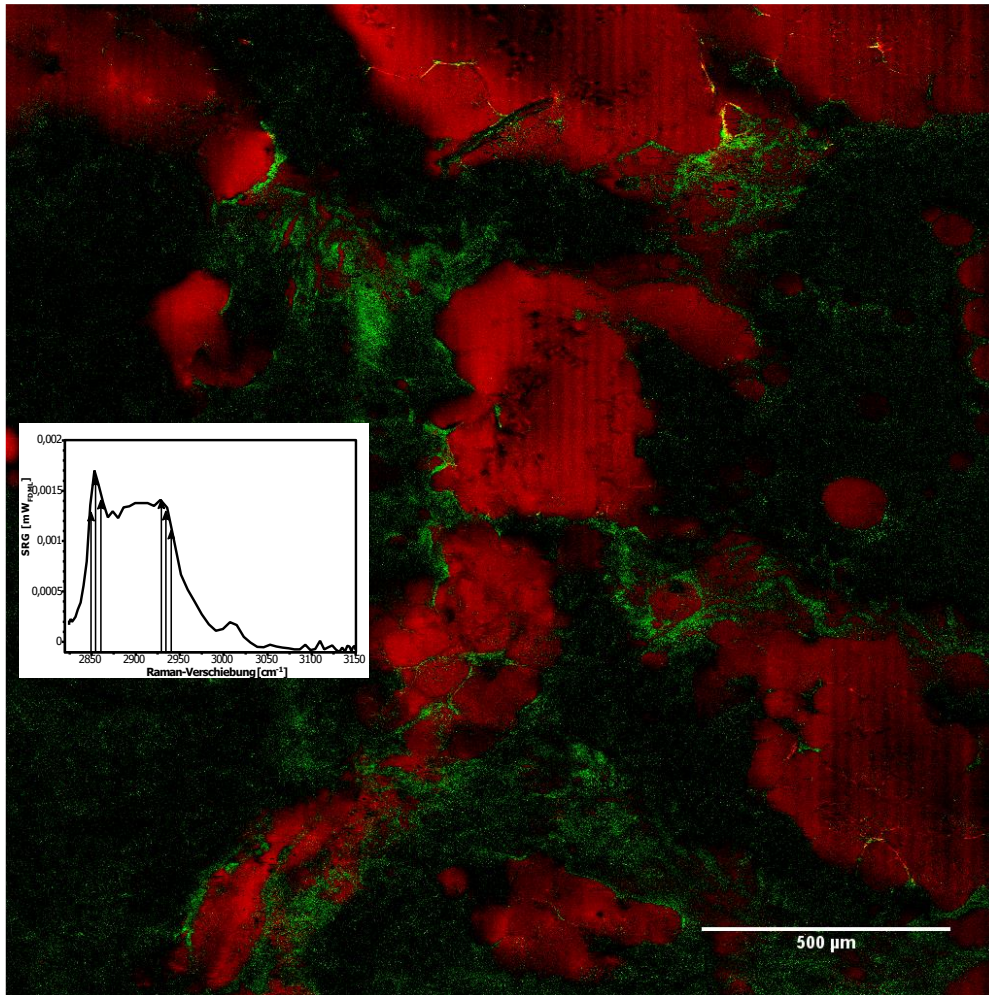


Abbildung 5-9 TICO-Raman Aufnahme von humaner Haut mit 6 spektralen Punkten. Jeweils 3 spektrale Punkte für die CH_2 - und CH_3 - Molekülbindung zum Trennen der lipid- und proteinreichen Gewebeanteile. Die Position der spektralen Punkte ist im überlagerten Spektrum dargestellt, welches zuvor mit 64 spektralen Punkten in einem Lipidtropfen aufgenommen wurde und die Informationsgrundlage der Sparse-Sampling-Konfiguration darstellt. Lipide sind rot dargestellt, wobei der grüne Proteinkanal ein schwellwertangepasstes Differenzbild ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$) ist [60]. Die Aufnahme ist 20-fach gemittelt mit einer Pixelaufnahmezeit von $335 \mu\text{s}$ und $\sim 5,6$ Minuten Gesamtaufnahmezeit für 1000×1000 Pixel, bei einem FOV von $2000 \times 2000 \mu\text{m}$. Die Pumpulspitzenleistung beträgt $1,6 \text{ kW}$, die FDML-Leistung beträgt $4,9 \text{ mW}$, was zu einem SRG von $7,94 \cdot 10^{-4}$ führt und nur ca. halb so hoch ist, wie das SRG des eingeblendeten Spektrums mit $1,7 \cdot 10^{-3}$.

Ein weiteres Beispiel für die TICO-Ramanmikroskopie von humaner Haut ist in Abbildung 5-10 dargestellt. Das gewählte FOV beträgt $500 \times 1000 \mu\text{m}$ mit 500×1000 Pixeln aufgenommen mit 2 spektralen Punkten. Die Aufnahme ist 30-fach gemittelt. Die spektralen Punkte decken die Lipid-Bande bei 2840 cm^{-1} sowie die Proteinbande bei 2930 cm^{-1} ab. Für diese Darstellung wurde auf das Differenzbild der zwei spektralen Kanäle für den Proteinkanal verzichtet: Die Rohdaten wurden Schwellwertangepasst und anschließend für den roten (Lipid) und blauen (Protein) Kanal im RGB-Farbmodell genutzt. Da nur zwei spektrale Punkte aufgenommen wurden, reduziert sich die Pixelaufnahmezeit auf $\sim 225 \mu\text{s}$ mit einer Gesamtaufnahmezeit von $\sim 1,8$ Minuten. Die FDML-Leistung betrug $3,8 \text{ mW}$ mit $1,6 \text{ kW}$ Spitzenleistung der Pumpulse. Das SNR beträgt $2,3$ mit einem SRG von $7,94 \cdot 10^{-4}$. Das SRG ist mit der Aufnahme zuvor vergleichbar, doch nimmt das SNR um das $\sim 3,5$ -

fache ab, obwohl die Aufnahme öfter gemittelt wurde. Betrachtet man die theoretische Zunahme des SNRs mit \sqrt{N} , müsste das SNR der 30-fach gemittelten Aufnahme ca. 14,2 betragen. Dieser Vergleich lässt außer Acht, dass in der Aufnahme mit 6 spektralen Punkten für jeden Farbkanal zwei spektrale Punkte gemittelt wurden, sodass ein SNR von ~ 7 für die Aufnahme erwartet werden kann. Unabhängig von der Abweichung der Bildqualität zwischen den Aufnahmen ist im aktuellen Aufbau die Nutzung mehrerer spektraler Punkte für jedes Ramanmerkmal der Aufnahme eines einzelnen spektralen Punktes vorzuziehen. Abweichungen der Bandenlage oder leichte Fehlanpassungen der FDML-Phase lassen sich durch die höhere Anzahl spektraler Punkte kompensieren. Außerdem erlaubt ein spektrales Mitteln die Bildqualität zu verbessern, wenn die Halbwertsbreite der Ramanbande größer ist als der durch spektrales Mittel abgedeckte Bereich.

Betrachtet man die Morphologie in Abbildung 5-10, sind einzelne Fetttropfen im unteren Bilddrittel erkennbar. Ein zentrales Merkmal ist ein Haar, das von Strukturen mit hohem Lipidanteil umgeben ist. Bei diesen Strukturen könnte es sich um Talgdrüsen handeln. Die kreisrunden Strukturen ohne Signal im Zentrum der Struktur sind charakteristisch für den Zellkern, der im 2840 cm^{-1} Kanal dunkel erscheint [36] [59] und kein Ramansignal aufweist. Zudem ist auffällig, dass im Bereich des Haars das Ramansignal stark abnimmt, was sich mit Ergebnissen anderer Publikation bei der SRS- und CARS-Bildgebung von Haut bzw. Talgdrüsen deckt [62] [59]. Das Haar ist innerhalb des Gewebes mit einer Lipidschicht umgeben [108], die ebenfalls ein Signal gibt und das Haar im 2840 cm^{-1} Kanal rötlich erscheinen lässt, wie im oberen Drittel in Abbildung 5-10. Das Haar selbst gibt kaum Signal bei 2840 cm^{-1} , sodass abhängig von der Ebene des Gefrierschnitts das Haar unterschiedlich hell erscheint. Neben lipidreichen Strukturen und ihrer Abgrenzung zu proteinreicheren Gewebeteilen, sind im CH-Streckbereich wenige Kontrastmechanismen für die Differenzierung unterschiedlicher Gewebetypen in Haut vorhanden. Zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch keine TICO-Raman Messung im Fingerprint-Bereich durchgeführt.

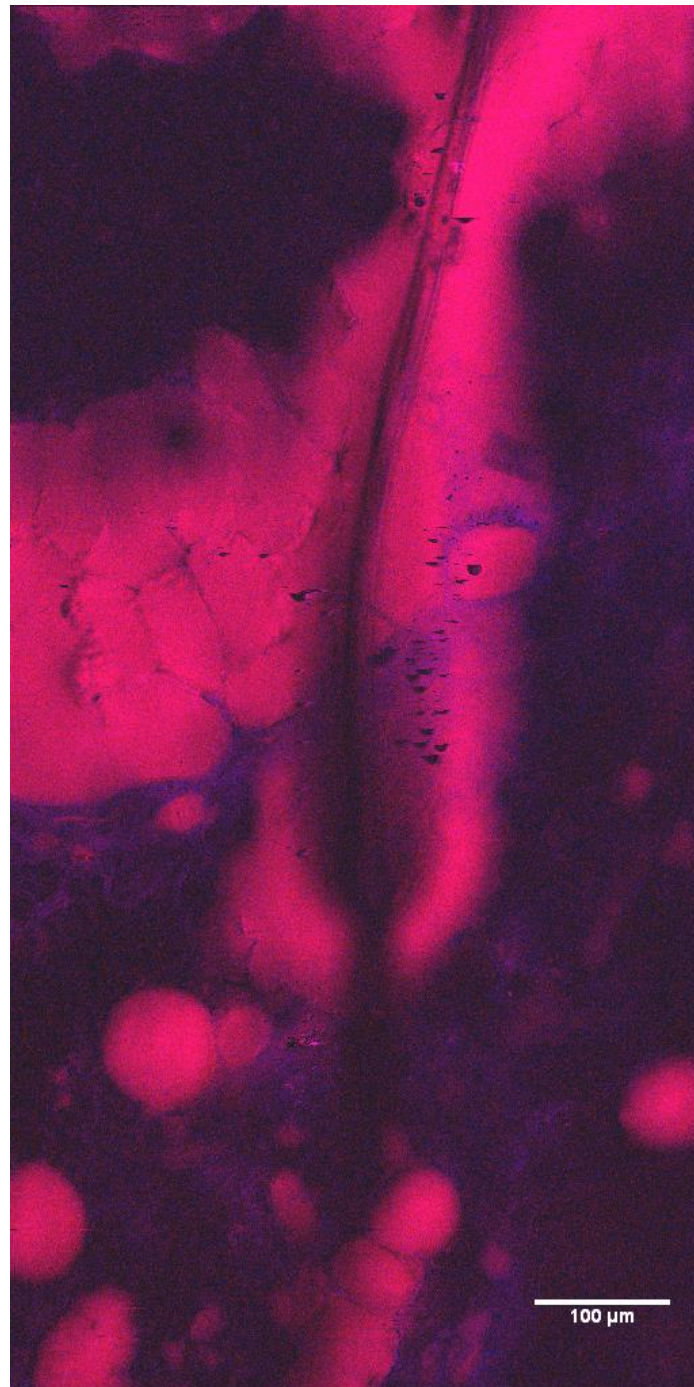


Abbildung 5-10 TICO-Raman Aufnahme von humaner Haut aufgenommen mit 2 spektralen Punkten und 30-fach gemittelten Daten im RGB-Farbmodell. Rot stellt das Lipid-Signal bei 2840 cm⁻¹ dar. Blau repräsentiert das Protein-Signal bei 2930 cm⁻¹ der CH₃- Molekülbindung und wurde ohne Differenzbildung zum Trennen des Lipid- und Proteinanteils genutzt. Neben den einzelnen Lipidtropfen im unteren Bilddrittel ist ein Haar sichtbar, das von lipidhaltigen Strukturen umgeben ist, wobei es sich um Talgdrüsen handeln könnte, die eine hohe Lipidkonzentration haben. Die Pixelaufnahmezeit beträgt ~225 µs. Für das FOV von 500x1000 µm mit 500x1000 Pixeln beträgt die Gesamtaufnahmezeit ca. 1,8 Minuten. SRG $7,94 \cdot 10^{-3}$, SNR 2,3

5.2.1.2 Spontane Ramanspektroskopie

Um einen Ausblick auf zukünftige TICO-Raman Anwendungen an humaner Haut zu geben, wurden spontane Ramanspektren mit dem Horiba XPlora Plus aufgenommen. In Abbildung 5-11 sind Beispielspektren der Epidermis, Dermis und Subkutis dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Signalhöhen im Fingerprint- und CH-Streckbereich sind die Bereiche getrennt dargestellt. Die Spektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm aufgenommen. Die Gesamtintegrationszeit eines Spektrums beträgt 25 Sekunden, wobei 5 Spektren einzeln aufgenommen und gemittelt wurden. Das verwendete Gitter hat 600 l/mm. Die spektrale Auflösung beträgt $3,7\text{ cm}^{-1}$. Die den einzelnen Ramanbanden zugewiesenen Molekülgruppen sind aus [66] entnommen.

Es lässt sich klar erkennen, dass neben der CH_3 -Streckschwingung um 2930 cm^{-1} eine weitere Ramanbande bei $2840\text{--}2880\text{ cm}^{-1}$ liegt. Für 2840 cm^{-1} liegt die CH_2 -Streckschwingung vor. Bei 2880 cm^{-1} handelt es sich um die antisymmetrische Fermiresonanz der CH_2 -Molekülschwingung. Neben dem CH-Streckbereich finden sich Banden im Fingerprint-Bereich. In der sehr fetthaltigen Subkutis ist bei der Betrachtung des gesamten Ramanspektrums von einem Lipid im Fokus auszugehen: Im CH-Streckbereich ist keine sich scharf abgrenzende Bande um 2930 cm^{-1} zu erkennen, aber die für Lipide charakteristische 2840 cm^{-1} und 2880 cm^{-1} Ramanbande. Im Fingerprintbereich bei 1743 cm^{-1} ist die charakteristische Ramanbande der Ester-Verbindungen in Fettsäuren ($\text{C}=\text{O}$) erkennbar. Für 1440 cm^{-1} und 1290 cm^{-1} ist die Scherschwingung der CH_2 -Verbindung verantwortlich. Der Ramanbande bei 1650 cm^{-1} können zwei Molekülbindungen zugeordnet werden: Für Lipide kann die $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung zugewiesen werden. Im selben Fenster liegt die Amide I Bande. Dieselbe Doppel-Zuweisung kann im Bereich um 1270 cm^{-1} getroffen werden. Hier ist ebenso die $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung und die Amide III Bande zugewiesen. Da die Anzahl der Lipid-Ramanbanden höher ist, wird von der $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung ausgegangen. Für die Bande bei 1150 cm^{-1} ist die C-H Molekülbindung verantwortlich und für 1003 cm^{-1} sowie 1070 cm^{-1} die C-C Streckschwingung. Zudem wird die Bande bei 1070 cm^{-1} mit Triglyceriden der Fettsäuren in Verbindung gebracht. Für die Ramanbande bei 1513 cm^{-1} konnte eine Übereinstimmung für Katenoide gefunden werden, die zu den Zellfarbstoffen gehören.

Das Ramanspektrum der Dermis grenzt sich im CH-Streckbereich durch die Ramanbande bei 2938 cm^{-1} ab. Des Weiteren ist bei 3326 cm^{-1} die O-H-Bindung von Wasser zu sehen. Die $\text{C}=\text{O}$ Verbindung bei 1740 cm^{-1} fehlt. Der Signalunterschied zwischen 1650 cm^{-1} und 1450 cm^{-1} nimmt ab und gleicht sich an. Ein höheres Signal bei 1450 cm^{-1} (CH_2) ist charakteristisch für Lipide und geht mit einem hohen Signal bei 2840 cm^{-1} einher, da dieselbe Molekülbindung verantwortlich ist (CH_2). Das breite Signal bei 1268 cm^{-1} ist charakteristisch für die Amide III Bande, die immer mit der Amide I Bande bei 1650 cm^{-1} gemeinsam auftritt, sodass im Allgemeinen nicht von einem reinen Lipid-Spektrum auszugehen ist. Für die Ramanbande um $1001,7\text{ cm}^{-1}$ kann Phenylalanin oder freies NADH verantwortlich sein. Generell kann die Ramanbande um 1000 cm^{-1} durch verschiedene

Schwingungsmoden von Phenylalanin bedingt sein. Für die Epidermis ist eine mit der Dermis vergleichbare Ramansignatur zu sehen, wobei das Ramansignal bei 2870 cm^{-1} nahezu die Amplitude der CH_3 -Streckschwingung bei 2930 cm^{-1} aufweist. Eine konkrete Zuweisung ist daher nicht möglich.

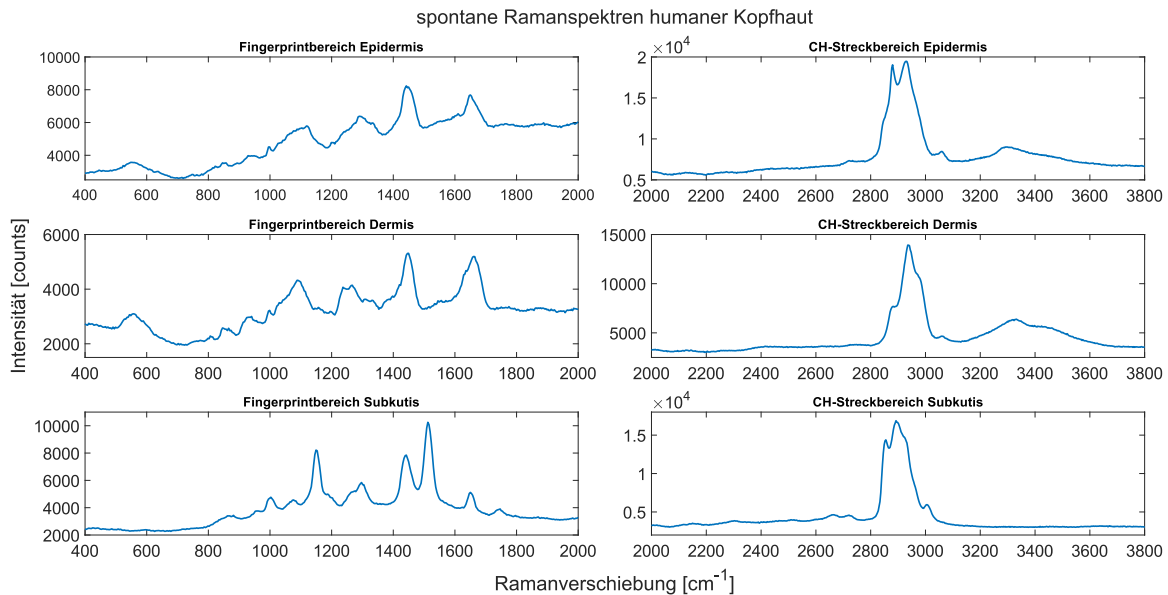


Abbildung 5-11 Spontane Ramanspektren humaner Haut für die Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Ramanspektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm und einer Leistung von 10 mW nach dem Objektiv aufgenommen. Jedes Spektrum wurde 5-fach gemittelt mit einer Gesamtaufnahmezeit von 25 s. Neben dem CH-Streckbereich lassen sich im Fingerprint-Bereich bis 1800 cm^{-1} die Ramanbanden für C=O bei 1743 cm^{-1} für Lipide (Subkutis), C=C Streckschwingung bei 1650 cm^{-1} (Subkutis), der Amide I Bande bei $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (Epidermis, Dermis), 1440 cm^{-1} CH_2 -Scherschwingung (alle Spektren), 1290 cm^{-1} CH_2 Scherschwingung (Subkutis), $1250\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ Amide III (Epidermis und Dermis), 1150 cm^{-1} C-H Streckschwingung (Subkutis) und die C-C Streckschwingungen bei 1000 cm^{-1} und $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ finden.

Zusammenfassend sind für die Hautproben im Fingerprintbereich charakteristische Ramanbanden zu finden, die jedoch weitestgehend die Unterscheidung von Lipiden und Proteinen im CH-Streckbereich um 2900 cm^{-1} unterstützen. Inwieweit neue Kontrastmechanismen für Haut im Fingerprint-Bereich gefunden werden können, muss in Zukunft durch weitere Experimente evaluiert werden. Anhand einzelner spontaner Ramanspektren auf unterschiedliche Gewebeklassen in Haut zu schließen, erscheint durch die präsentierten Ergebnisse möglich. Eine Unterscheidung anhand von Lichtmikroskopieaufnahmen ist jedoch ebenso möglich, sodass die Ramananwendung spezifischer sein sollte.

Neben der Abgrenzung von Lipid- zu proteinreicheren Gewebe im CH-Streckbereich, könnten Entzündungsreaktionen oder die Wundheilung in Haut mithilfe von Ramantechniken überwacht werden. Unterschiedliche Proteinkonformationen durch Entzündungsreaktionen könnten sich in einer geänderten Sekundärstruktur der Proteine äußern, die möglicherweise anhand der Amide I Bande detektierbar sind. Eine Kombination mit weiteren Ramanbanden könnte zu einem multispektralen Ramankontrast führen. Dem vorangestellt ist das Anfertigen einer Ramandatenbank mit Referenzspektren, um eine gezielte Analyse einzelner Gewebeklassen in Haut zu ermöglichen.

5.2.2 Schweinehirn

Wie im Verlauf dieser Arbeit bereits erläutert, ist der erfolgreiche Einsatz von SRS-Techniken maßgeblich von der untersuchten Probe abhängig. Neben Fettgewebe hat das Hirngewebe einen hohen Lipidanteil. Das Hirngewebe kann vereinfacht in die weiße und graue Substanz unterteilt werden. Die Bezeichnung weiß ist hierbei auf den Myelin-Gehalt zurückzuführen, der durch seinen hohen Lipidanteil einen weißlichen Eindruck bei der makroskopischen Betrachtung erzeugt. Das Trockengewicht der Lipide beträgt für Myelin 78-81 %, für die weiße Substanz im Allgemeinen 49-66 % und für die graue Substanz 36-40 % [109]. Myelin ist eine Biomembran und ermöglicht eine hohe Geschwindigkeit für die Erregungsweiterleitung in Nervengewebe. Die weiße Substanz des Gehirns enthält mehr Nervenfasern, wohingegen die graue Substanz³⁵ mehr Nervenzellkörper enthält und daher einen niedrigeren Lipidanteil aufweist.

5.2.2.1 TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich

Für die SRS-Bildgebung ist Hirngewebe durch den hohen Anteil von CH₂- und CH₃-Molekülgruppen beim Aufbau der Lipide und Proteine geeignet, um hohe Bildgebungsgeschwindigkeiten zu erreichen. Des Weiteren erlaubt der strukturelle Aufbau aus proteinreichen Nervenzellkernen und lipidreichen Nervenfasern eine Abgrenzung von Zellkernen gegenüber dem restlichen Nervengewebe.

Hierfür wird zuerst das Ramansignal bei 2850 cm⁻¹ separiert, um das lipidhaltige Gewebe mit vielen CH₂-Molekülgruppen vom übrigen Gewebe zu trennen. Das Ramansignal bei 2935 cm⁻¹ ist für proteinreiches Gewebe höher, hat aber einen spektralen Überlapp mit dem Ramansignal bei 2850 cm⁻¹, das für die Kontrastierung der lipidreichen Strukturen genutzt wurde. Für die Isolation des Proteinanteils des Ramansignals kann daher die Differenz (2935 cm⁻¹ - 2850 cm⁻¹) der beiden Kanäle gebildet werden.

Für erste Testmessungen wurde Hirngewebe von Hausschweinen genutzt. Das Gewebe wurde zuvor in ein Einbettungsmedium eingefasst und anschließend mit flüssigem Stickstoff gefroren, um den Gefrierschnitt zu vereinfachen und ein besseres Schnittbild zu erhalten. Anschließend wurden Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von 7 µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

Dargestellt in Abbildung 5-12 ist eine TICO-Raman Aufnahme von Hirngewebe, aufgenommen mit 64 spektralen Punkten im spektralen Fenster von 2750-3040 cm⁻¹. Das FOV beträgt 500 x 500 µm mit 500 x 500 Pixeln. Die TICO-Aufnahme wurde 40-fach gemittelt und mit 5 mW FDML-Leistung und 1,6 kW Spitzenleistung der Pumpulse aufgenommen. Das SNR der Aufnahme beträgt 5,5 mit einem SRG von

³⁵ Die Bezeichnung grau ist auf totes und präpariertes Hirngewebe bezogen. Im lebenden Gewebe ist die graue Substanz hellrot/rosa.

$3,49 \cdot 10^{-4}$. Die Pixelintegrationszeit beträgt 6,24 ms, was zu einer Gesamtaufnahmedauer von 26 Minuten führt. Für die Darstellung der TICO-Raman Daten wurde das RGB Farbmodell genutzt. Die hohe Anzahl spektraler Punkte ermöglicht es, die Daten spektral zu mitteln, wobei 3 spektrale Punkte gemittelt wurden. Das abgedeckte spektrale Fenster entspricht 290 cm^{-1} . Bei 3-fach spektral gemittelten Daten steigt die spektrale Abdeckung eines Raman-Kanals von $4,53 \text{ cm}^{-1}$ auf $13,59 \text{ cm}^{-1}$ und liegt immer noch im Bereich biologischer Ramanbanden mit einer spektralen Breite von ca. $\sim 20 \text{ cm}^{-1}$ [39]. Der rote Kanal stellt das Ramansignal bei 2870 cm^{-1} dar. Für den blauen Farbkanal wurde das Differenzbild aus $2950\text{-}2870 \text{ cm}^{-1}$ genutzt, wobei die Intensität des 2950 cm^{-1} Kanals angepasst wurde, sodass nach der Differenzbildung lediglich das Protein-Signal verbleibt. Diese Anpassung ist nötig, da sich die spektralen Verläufe von Protein und Lipiden überlagern und ein nahezu gleich hohes Signal geben, wie die Spektren in Abbildung 5-12 belegen. Die Spektren unter dem Bild wurden über die im Bild markierten ROIs integriert. Die ROIs kennzeichnen die beiden vorherrschenden spektralen Signaturen sowie die Mischung der zwei charakteristischen Ramanspektren. Für Lipide ist eine Erhöhung des Ramansignals bei 2870 cm^{-1} zu erkennen, mit einer Abnahme der Intensität zu höheren Wellenzahlen. Im Gegensatz dazu nimmt die Intensität im blauen Spektrum (proteinreiche Strukturen) zu, bis zu seinem Maximum bei $\sim 2950 \text{ cm}^{-1}$. Das grüne Spektrum stellt den weniger charakteristischen Anteil der Daten dar, für den im gleichen Maße Protein- und Lipid-Anteile vorliegen. Die dunklen Strukturen sind Löcher im Gewebe, in denen kein Ramansignal gemessen wurde. Bei den sich teilweise scharf abgrenzenden blauen Bereichen könnte es sich um Neuronen handeln. Am rechten Bildrand erscheint das blaue Protein-Signal flächiger. Die roten Strukturen könnten Nervenfasern sein, deren hoher Lipidanteil durch die Myelinscheide bedingt ist.

Unabhängig von der klaren Differenzierung unterschiedlicher Gewebeanteile durch ihre Ramanspektren weichen die TICO-Raman Daten von den erwarteten Zielwerten ab. Die Position der Ramanbanden ist zu höheren Wellenzahlen verschoben. Mit großer Übereinstimmung werden in der Forschungscommunity, für die Auswertung von Hirngewebe, die Ramanbanden bei 2850 cm^{-1} und 2935 cm^{-1} genutzt [35, 60] [19-21]. Dieselben Ramanbanden liegen hier um ca. 20 cm^{-1} versetzt bei 2870 cm^{-1} und 2950 cm^{-1} . Zwischen den beiden genannten Banden kann im roten und grünen Spektrum eine weitere Ramanbande erkannt werden. Diese Struktur liegt bei ca. 2910 cm^{-1} und könnte zur Stearinsäure gehören, deren Signal normalerweise bei 2880 cm^{-1} liegt [76]. Betrachtet man nur die Ramansignatur, unabhängig der Bandenlage, korrespondiert das rote Spektrum zur weißen Substanz, das grüne Spektrum zum Cortex und das blaue Spektrum zu proteinreicheren Gewebeanteilen, die in der Literatur durch die höhere Zelldichte tumorösem Gewebe zugeordnet wird [110]. Bei dem verwendeten Schweinehirn handelt es sich um gesundes Gewebe. Die Übereinstimmung der TICO-Raman Spektren mit den Daten etablierter Systeme in der klinischen Anwendung bekräftigen jedoch den Einsatz von TICO-Raman in der biomedizinischen Optik.

Für die hier vorgestellte Messung mit 64 spektralen Punkten, einer bekannten Ramansignatur und einer bekannten Methode für die Auswertung der Ramandaten, ist der spektrale Versatz für die Bildqualität unwichtig. Sollen im Gegenzug nur wenige spektrale Punkte in einer Sparse-Sampling Anwendung genutzt werden, ist die exakte Lage der Pumpulse gegenüber dem FDML-Abstimmbereich unabdingbar. Für unbekannte Proben oder bei der Messung von Verschiebungen der Ramanbanden führen derartige Fehler zu verfälschten Ergebnissen und sind nicht tolerierbar. Dennoch zeigt die Flexibilität bei der Verwendung unterschiedlicher spektraler Punkte, dass TICO-Raman in der Lage ist auf veränderte Randbedingungen zu reagieren. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber der Aufnahme ganzer spontaner Ramanspektren mit langen Integrationszeiten oder dem Fokus auf einzelne spektrale Punkte in SRS und CARS Anwendungen.

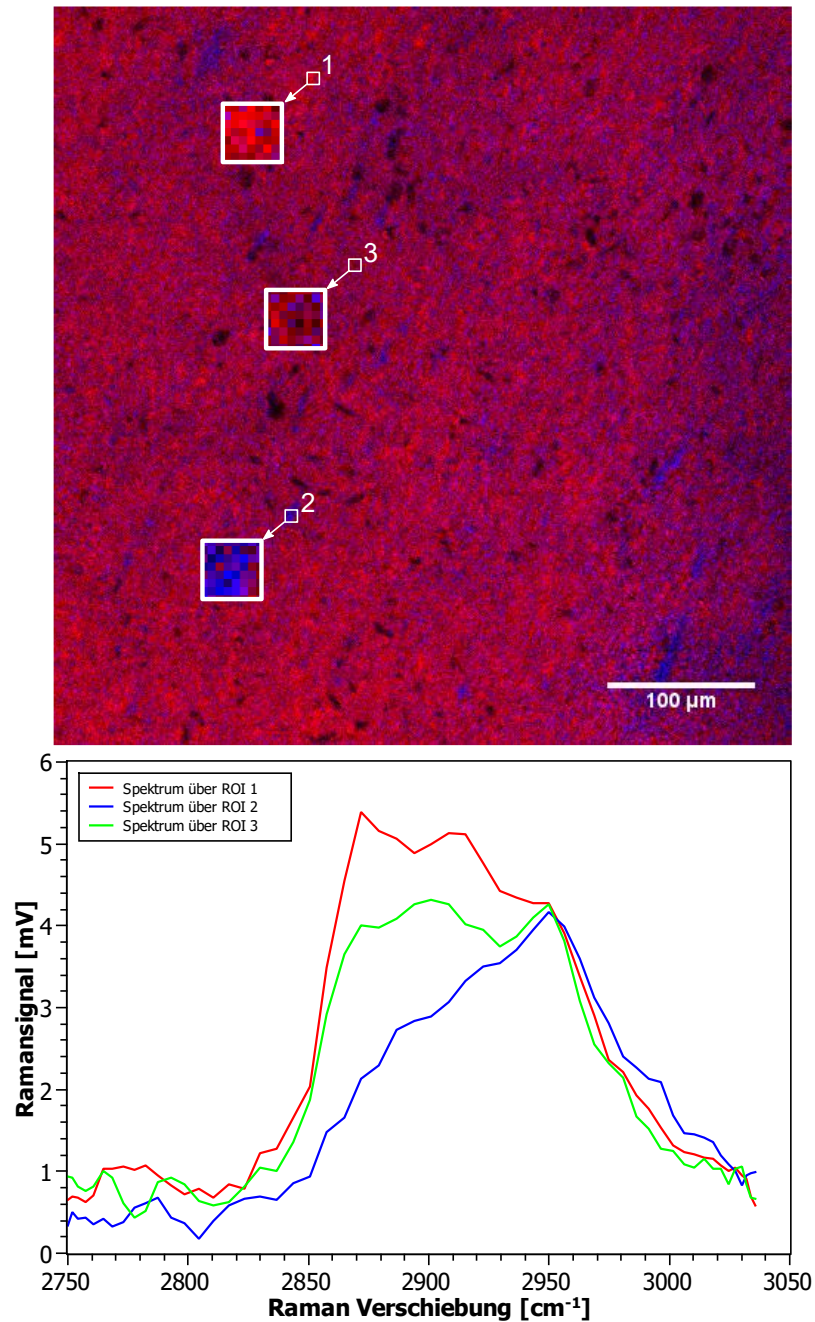


Abbildung 5-12 TICO-Raman Aufnahme eines Schweinehirn-Gefrierschnitts. Das FOV beträgt $500 \times 500 \mu\text{m}$ mit 500×500 Pixeln. Es wurden 64 spektrale Punkte im spektralen Fenster von $2750\text{-}3040 \text{ cm}^{-1}$ aufgenommen, wobei die Aufnahme 40-fach gemittelt ist. Die Pixelintegrationszeit beträgt $6,24 \text{ ms}$ mit einer Gesamtaufnahmedauer von 26 Minuten. Die FDML-Leistung betrug 5 mW . Die Spitzenleistung der Pumpulse betrug $1,6 \text{ kW}$, was zu einem von SRG von $3,94 \times 10^{-4}$ führt. Der rote Kanal stellt das Ramansignal bei 2870 cm^{-1} dar. Der blaue Kanal wird durch Schwellwertanpassung des Protein-Signals bei 2950 cm^{-1} und der anschließenden Differenzbildung mit dem Ramansignal bei 2870 cm^{-1} gebildet ($2950 - 2870 \text{ cm}^{-1}$). ROI1 und ROI2 stellen Bereiche mit unterschiedlicher Ramansignatur dar, die für die Kontrastierung genutzt wurden und unter dem Bild abgebildet sind. ROI3 fasst einen Bereich ein, der beide Raman-Signaturen enthält, was das grüne Spektrum verdeutlicht. Die dunklen Bereiche im Bild haben kein Ramansignal und sind Löcher im Gewebe.

Die TICO-Raman Aufnahme in Abbildung 5-13 zeigt ebenfalls einen Schweinehirn-Gefrierschnitt. Hierbei handelt es sich möglicherweise um einen anderen Teil des Gehirns. Die verwendeten Laserleistungen sind 4,3 mW für den FDML-Laser und 1,6 kW Spitzenleistung der Pumppulse, was zu einem SRG von $7,34 \cdot 10^{-4}$ und einem SNR von 7,6 führt. Das FOV ist $500 \times 500 \mu\text{m}$ groß und mit 500×500 Pixeln aufgenommen. Die Aufnahme ist wieder 40-fach gemittelt und mit 64 spektralen Punkten aufgenommen. Es wurden drei spektrale Punkte gemittelt für die Darstellung der Daten. Die Pixelaufnahmezeit ist wie zuvor 6,24 ms, mit einer Gesamtaufnahmezeit von 26 Minuten. Zum Einfärben wird das RGB Farbmodell genutzt. Der rote Kanal stellt das Ramansignal bei $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ dar. Das ROI1 im Bild mit dem dazugehörigen Ramanspektrum darunter stellt die Ramansignatur für den Lipidkanal dar. Der grüne Kanal ist wie zuvor durch die Differenzbildung aus dem Lipid-Kanal und dem Ramansignal bei 2950 cm^{-1} errechnet. ROI2 und das zugehörige Spektrum kennzeichnen die grünen proteinreichen Strukturen im Bild. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Daten normiert, da das Protein-Signal doppelt so hoch ($\sim 10 \text{ mV}$) ist, im Vergleich zum mittleren Lipidsignal mit $\sim 5 \text{ mV}$. Dies erklärt auch die Abweichung des SRGs ($3,49 \cdot 10^{-4}$ zu $7,34 \cdot 10^{-4}$) zwischen den beiden Aufnahmen des Schweinehirns. In der Aufnahme aus Abbildung 5-12 liegt das höchste Ramansignal mit 5 mV vor, wobei in Abbildung 5-13 für Proteine $\sim 10 \text{ mV}$ erreicht wurde, trotz niedriger FDML-Laserleistung bei gleicher Pulsspitzenleistung.

Insgesamt zeigt die Aufnahme statt einzelner begrenzter Löcher sich verästelnde Strukturen ohne Ramansignal, an deren Rändern runde Strukturen mit hohem Proteinsignal in Grün erkennbar sind. Obwohl die lipid-haltigen Strukturen in Rot flächiger auftreten, ist ein höheres Lipidsignal im Übergang zu Bereichen ohne Signal erkennbar. Dies ist besonders im linken unteren Bildabschnitt zu beobachten. Vergleicht man die Aufnahme mit den Ergebnissen aus Abbildung 5-12, fällt eine unterschiedliche Morphologie der Probe auf, die auf unterschiedliche Bereiche im Gehirn schließen lassen. Auf eine genauere Beurteilung der aufgenommenen Bildausschnitte wurde im ersten Test verzichtet, da hier lediglich die Anwendungsmöglichkeiten von TICO-Raman ausgelotet werden. Auch in dieser Aufnahme weicht die Lage der Ramanbanden von den erwarteten Positionen ab. Anzumerken ist, dass beide Aufnahmen an einem Tag entstanden sind und es sich hierbei um einen zufälligen Fehler handeln könnte.

Zusätzlich bleibt die Signalhöhe unter den Erwartungen, da Hirngewebe in der Forschungscommunity als Probe mit hohem Signal bekannt ist. Zudem wurde für das Hautgewebe (vgl. Abschnitt 5.2.1) bei vergleichbarer Laser-Leistung ein doppelt so hohes Ramansignal von $\sim 20 \text{ mV}$ gemessen. Das kleinere Signal kann auf die Probendicke von $7 \mu\text{m}$ zurückzuführen sein. Für die verwendete Objektivlinse (Thorlabs C230TMD-C, vgl. Abschnitt 4.3.1) wurde eine Fokustiefe (doppelte Rayleighlänge) von $\sim 3,5 \mu\text{m}$ errechnet. Als Folge kann ein axialer Versatz des Fokus bei einer Schichtdicke von $7 \mu\text{m}$ zu einer Abnahme des Ramansignal führen, was eine mögliche Erklärung für das kleine Ramansignal darstellt.

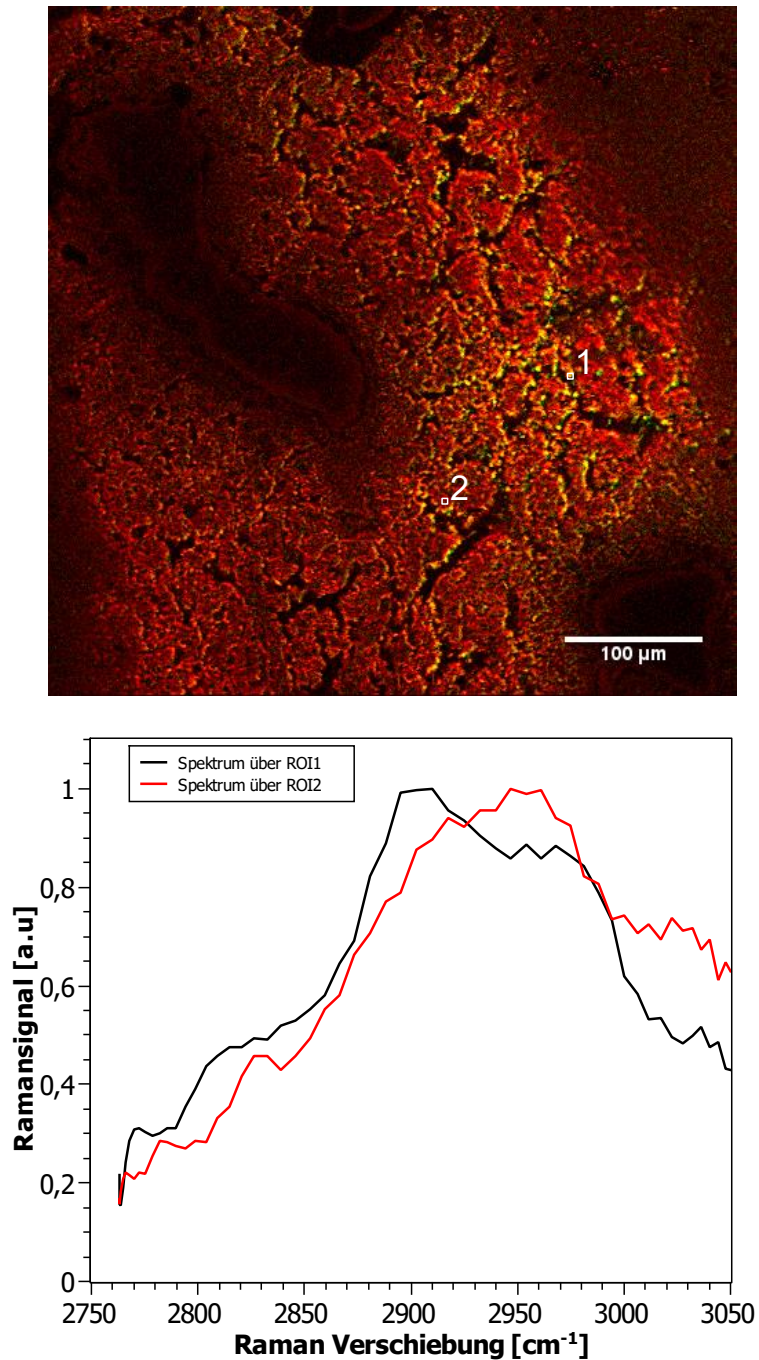


Abbildung 5-13 TICO-Raman Aufnahme von Schweinehirn. Das FOV beträgt 500 x 500 µm mit 500 x 500 Pixeln. Es wurden 64 spektrale Punkte im spektralen Fenster von 2760-3060 cm⁻¹ aufgenommen. Die 40-fache Mittelung der Daten führt zu einer Pixelintegrationszeit von 6,24 ms, mit einer Gesamtaufnahmedauer von 26 Minuten. Lipidhaltige Strukturen sind rot dargestellt und entsprechen dem Raman-Signal bei ~2900 cm⁻¹, wie ROI1 mit dem dazugehörigen Spektrum verdeutlicht. Die proteinreichen Strukturen sind grün dargestellt, wofür das zu ROI2 gehörige Spektrum mit maximalen Ramansignal bei ~2950 cm⁻¹ genutzt wurde. Für jeden Kanal wurden zuvor 3 spektrale Punkte gemittelt.

5.2.2.2 Spontane Ramanspektroskopie

In Abbildung 5-14 ist ein spontanes Ramanspektrum der zuvor mittels TICO-Raman aufgenommenen Schweinehirn-Probe dargestellt. Die Anregungswellenlänge ist 532 nm, mit einer optischen Leistung von 10 mW auf der Probe. Das verwendete Gitter hat 600 l/mm. Die spektrale Auflösung beträgt $3,49\text{ cm}^{-1}$. Das dargestellte Spektrum ist 5-fach gemittelt mit einer Gesamtintegrationszeit von 25 Sekunden. Die den Ramanbanden zugewiesenen Molekülbindungen sind aus [66] entnommen, wenn sie nicht anders zitiert sind.

Klar zu erkennen ist der breite CH-Streckbereich von $2800\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$. Gekennzeichnet sind die Ramanbanden, die für die Kontrastierung von Hirngewebe genutzt werden. Die symmetrische CH_2 -Streckschwingung liegt hier bei 2850 cm^{-1} und nicht wie in den TICO-Raman Daten bei 2870 cm^{-1} . Für das Ramansignal bei 2888 cm^{-1} ist die antisymmetrische CH_2 -Streckschwingung verantwortlich, die in den TICO-Daten bei $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ liegt. Die symmetrische CH_3 -Streckschwingung liegt bei 2930 cm^{-1} und innerhalb der TICO-Daten bei ca. 2950 cm^{-1} . Die Abweichung von 20 cm^{-1} für alle Ramanbanden der TICO-Daten und die Bestätigung der erwarteten Position durch das spontane Ramanspektrum bekräftigt das Vorliegen eines zufälligen Messfehlers.

Außerhalb des CH-Streckbereichs kann die Amide I Bande bei 1650 cm^{-1} und die CH_2 -Scherschwingung bei 1432 cm^{-1} genannt werden. Die Amide III Bande ist um 1290 cm^{-1} erkennbar. Die Ramanbande bei 1575 cm^{-1} kann zu Guanin und Adenin gehören. Bei 1117 cm^{-1} kann es sich um Glucose handeln, wobei die Ramanbande bei 1076 cm^{-1} zur C-C Streckschwingung gehört. Eine Schwingungsmode der DNS liegt um 740 cm^{-1} . Wie im Kapitel 5.2.1 für die humane Haut bereits beschrieben, ist die Interpretation von Ramanspektren nicht eindeutig und bedarf einer größeren Datenbasis, um eine verlässliche Aussage treffen zu können. Das höhere Ramansignal bei 2930 cm^{-1} im Vergleich zum Ramansignal bei 2888 cm^{-1} sowie die ausgeprägte Amide I Bande bei 1650 cm^{-1} , sprechen für proteinreiches Gewebe im Laserfokus. Dies wird unterstützt durch die Abwesenheit des, für Lipide charakteristischen Ramansignals um 1750 cm^{-1} . SRS-Anwendungen in Hirngewebe außerhalb des CH-Streckbereichs, fokussieren die Amide I Bande um 1650 cm^{-1} [41, 111]. Eine Blau-Verschiebung der Amide I zeigt eine geänderte Sekundärstruktur der Proteine an. Diese Verschiebung kann für die Darstellung von Amyloid-Ansammlungen in Alzheimer erkrankten Mäusegehirnen genutzt werden. Andere Anwendungen im Fingerprintbereich fokussieren ebenfalls die Amide I Bande, Cholesterol oder lipidhaltige Strukturen [46].

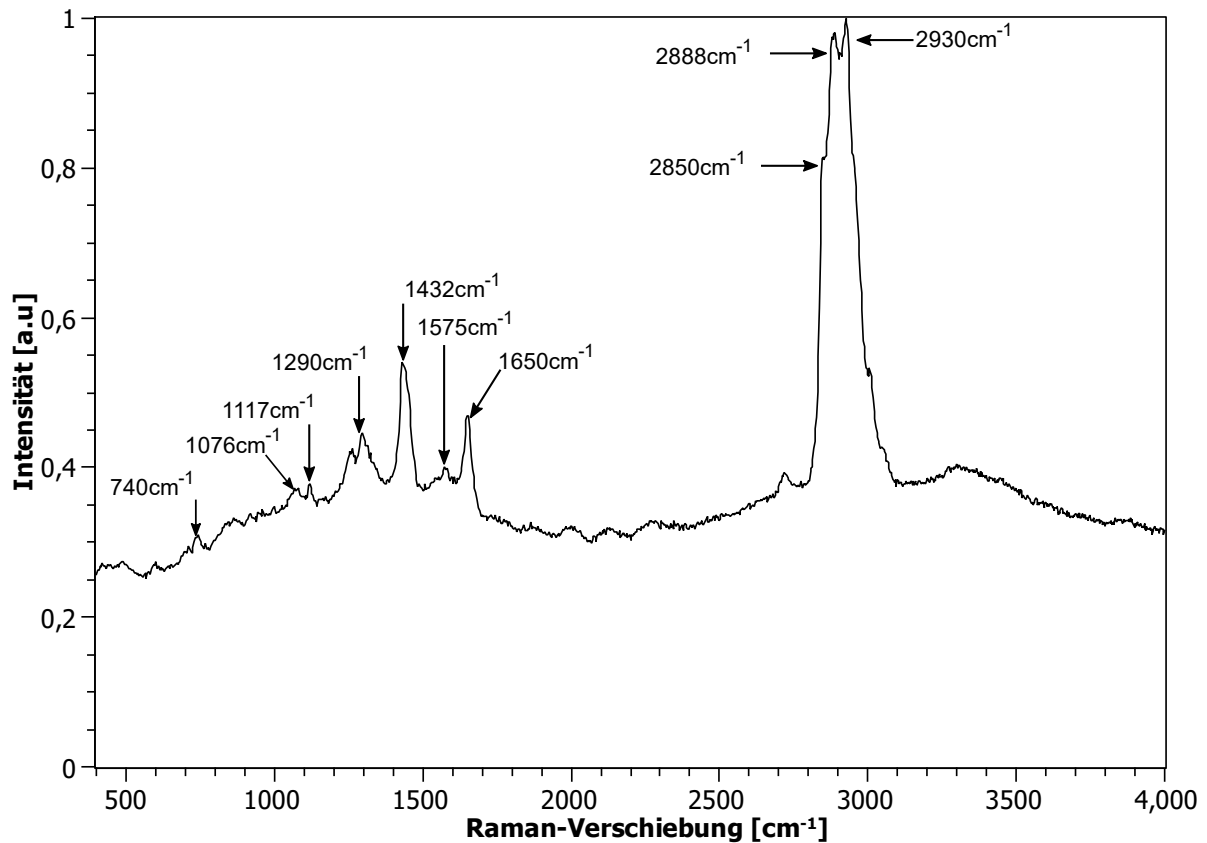


Abbildung 5-14 Spontanes Ramanspektrum eines Schweinehirn-Gefrierschnitts. Die Anregungswellenlänge ist 532 nm mit einer Leistung von 10 mW auf der Probe. Das optische Gitter hat 600 l/mm – die spektrale Auflösung beträgt $3,7 \text{ cm}^{-1}$. Gesamtintegrationszeit 25 s. CH-Streckbereich: 2930 cm^{-1} symmetrische CH_3 Streckschwingung, 2888 cm^{-1} antisymmetrische CH_2 Streckschwingung, 2850 cm^{-1} symmetrische CH_2 Streckschwingung. Fingerprint Bereich: 1650 cm^{-1} Amide I Bande, 1575 cm^{-1} Adenin/Guanin, 1432 cm^{-1} CH_2 Scherschwingung, 1290 cm^{-1} Amide III, 1117 cm^{-1} möglicherweise Glucose, 1076 cm^{-1} C-C Streckschwingung, 740 cm^{-1} Schwingungsmode der DNS.

5.2.3 Nasenmuschel

Die Nasenmuschel ist Teil der Nasenhöhle und wird in die untere, mittlere und obere Nasenmuschel unterteilt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gefrierschnitte der unteren Nasenmuschel verwendet. Auf der knöchernen Stützstruktur liegt die Nasenschleimhaut auf, die für die Reinigung, Befeuchtung und das Erwärmen der Atemluft verantwortlich ist.

Die Gefrierschnitte wurden von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Lübeck) angefertigt. Alle Patienten wurden in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, behandelt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Universität Lübeck (Genehmigungsnummer 16-278) genehmigt und in Übereinstimmung mit den in der WMA-Deklaration von Helsinki formulierten ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung durchgeführt.

Die Nadelbiopsie-Proben wurden als 20 μm dicke Gefrierschnitte auf Standardobjektträgern aufgebracht. Die Biopsien stammen von gesundem Gewebe und haben keine krankhaften Veränderungen.

5.2.3.1 TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich

Die Verwendung von Gewebeproben des Hals-Nasen-Raums ist durch ihre Lage motiviert. In vivo Anwendungen über Endoskope sind im Vergleich zu anderen Körperregionen einfacher realisierbar. Das Gewebe des Hals-Nasen-Raums stellt keine typische Ramanprobe dar, die durch hohe Signalintensitäten bekannt ist. Eine Bildgebung mittels TICO-Raman würde nicht nur die Stellung von TICO-Raman in der Forschungscommunity stärken, sondern auch einen Beitrag für zukünftige mögliche Anwendungsfelder von SRS-Techniken legen.

Im ersten Schritt wird untersucht, welche spektrale Signatur im CH-Streckbereich zu erwarten ist. Hierfür wird das Gewebe mit 64 spektralen Punkten im Bereich von 2750-3040 cm^{-1} abgetastet. In Abbildung 5-15 ist links das Ergebnis für die Aufnahme mit 64 spektralen Punkten dargestellt. Wie zuvor stellt rot lipidhaltiges Gewebe dar, welches hier dem spektralen Kanal bei 2870 cm^{-1} entspricht. Die grünen Strukturen stellen die Differenz aus Lipid- und Proteinkanal dar. Die Spektren unter der Aufnahme wurden über die zwei eingezeichneten ROIs (5 x 5 Pixel) gebildet. Die Ramansignatur der Nasenmuschel zeigt dieselben Schwingungen im CH-Streckbereich, wie die bereits zuvor diskutierten Gewebetypen (Haut- und Hirngewebe). Mit diesem a priori Wissen kann Sparse Sampling mit einer geringeren Anzahl spektraler Punkte umgesetzt werden. Die Ergebnisse desselben FOV mit 8 spektralen Punkten ist rechts in Abbildung 5-15 dargestellt. Beide Datensätze wurden gleich ausgewertet, mit identischer Position der ROIs zum Darstellen der Ramanspektren unter der Aufnahme. Vergleicht man die Spektren unter der Aufnahme zwischen 8 und 64 spektralen Punkten, können dieselben Merkmale erkannt werden. Sowohl die Bandenlage als auch der spektrale Verlauf lässt sich in beiden

Konfigurationen erkennen. Auch der visuelle Vergleich zeigt keinen Unterschied zwischen den Aufnahmen. Für eine optimale Vergleichbarkeit wurden die Rohdaten genutzt und auf nachträgliches spektrales Mitteln sowie eine Glättung des Spektrums mithilfe des Savitzky-Golay-Filters verzichtet. Für beide Aufnahmen wurden identische Laserparameter genutzt – 1.6 kW Spitzenleistung der Pumppulse und ~4.6 mW Abtastlicht des FDML-Lasers. Beide Aufnahmen wurden 20-fach gemittelt. Für die Aufnahme mit 64 spektralen Punkten führt dies zu einer Pixelintegrationszeit von 3,2 ms. Die Sparse Sampling Aufnahme ist 7,2-fach schneller mit einer Pixelintegrationszeit von 432 μ s. Die durchschnittliche Höhe des Ramansignals entspricht in beiden Aufnahmen ~5 mV und führt zu einem SRG von $3,45 * 10^{-4}$. Das SNR beträgt 3,2.

Die biomedizinische Aussagekraft der Aufnahme ist jedoch beschränkt. Es lassen sich zwar lipidreiche von proteinhaltigen Strukturen unterscheiden, doch fehlt aktuell die Anwendung bzw. eine größere Datenbasis und Vergleiche mit anderen Bildgebungsmodalitäten, um die Aussagekraft der Ramaninformation besser bewerten zu können.

Da TICO-Raman ein hyperspektrales Bild mit aktuell bis zu 64 Informationskanälen zur Verfügung stellt, ist die Auswertung der Ramandaten auf der Basis weniger spektraler Punkte ein Nachteil, da ungenutzte Informationen die Aufnahmezeit verlängern und die Probenbelastung durch die längere Expositionszeit des hochintensiven Pumplichts erhöhen. Die Auswertung der Daten ist am effizientesten, wenn alle Informationen einfließen. Dies kann einerseits durch die Wahl der spektralen Punkte geleistet werden oder durch die Datenauswertung erfolgen.

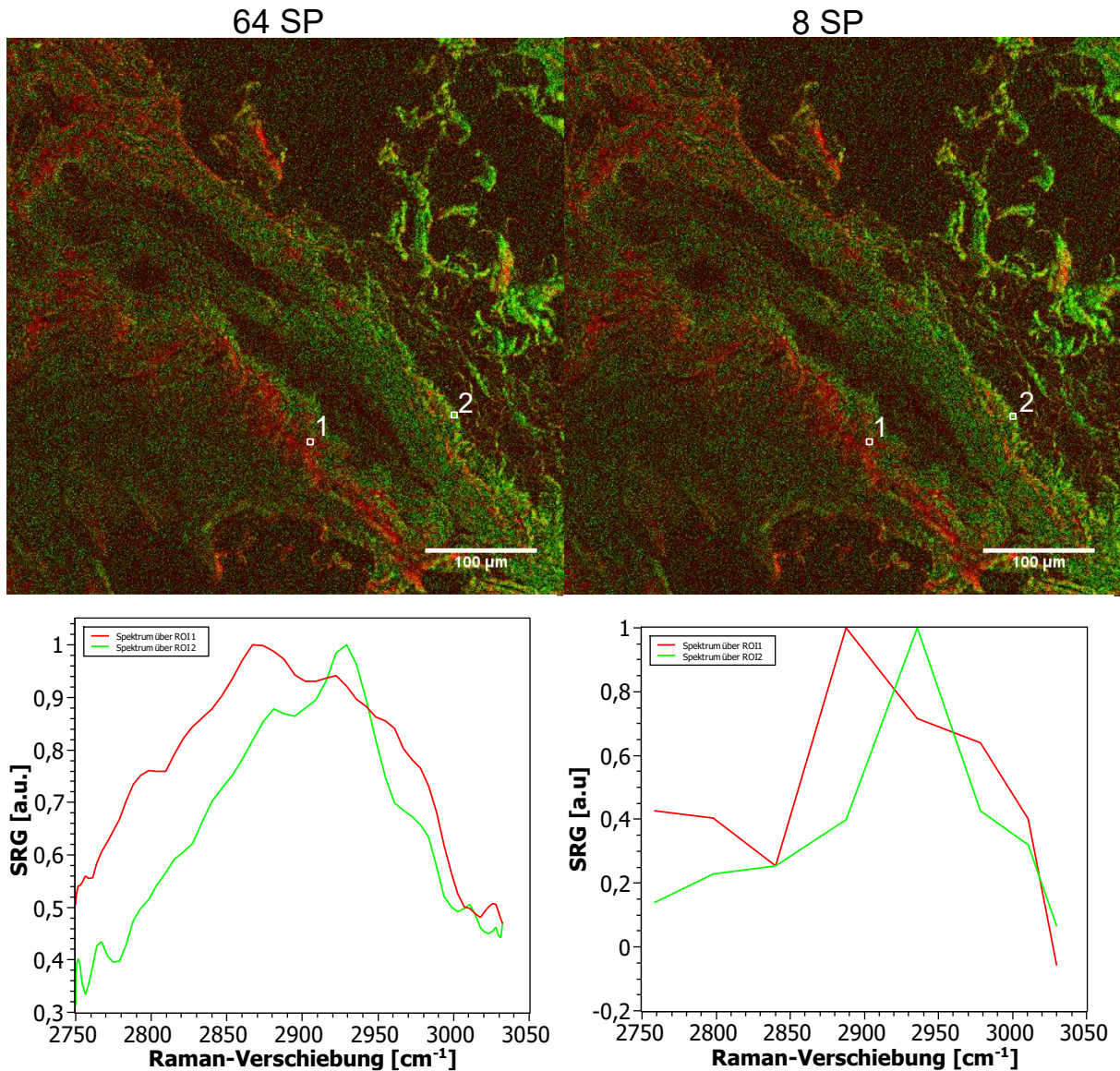


Abbildung 5-15 TICO-Aufnahme eines Nasenmuschel-Gefrierschnitts. Dasselbe FOV mit einer Größe von $500 \times 500 \mu\text{m}$ (500×500 Pixel) wurde mit 64 spektralen Punkten (SP) und mit 8 spektralen Punkten in Sparse-Sampling Konfiguration aufgenommen. Der grüne Ramankontrast wurde durch die Differenz der spektralen Kanäle um 2930 cm^{-1} und 2870 cm^{-1} gebildet. Die roten Strukturen stellen direkt das Ramansignal um 2870 cm^{-1} dar. Die 5×5 Pixel großen ROIs liegen in beiden Aufnahmen an derselben Position. Die dazugehörigen über die ROI gemittelten Spektren sind darunter dargestellt. Für beide Aufnahmen wurden die Rohdaten genutzt, um einen optimalen Vergleich zu erhalten. Beide Aufnahmen sind 20-fach gemittelt. Die Pixelaufnahmezeit für 64 spektrale Punkte beträgt $3,1 \text{ ms}$ und $432 \mu\text{s}$ für 8 spektrale Punkte.

Weitere Methoden zur Auswertung des hyperspektralen Datensatzes stellen die Klasse der multivariaten Analyseverfahren dar. Im ersten Schritt wurde eine Hauptkomponentenanalyse (engl. principal component analysis – PCA) der Daten vorgenommen. Hierzu wurde die in Matlab implementierte und öffentlich verfügbare Software Hypertools³⁶ genutzt [112, 113]. Zuvor wurde ein weiterer Gefrierschnitt mit 64 spektralen Punkten aufgenommen. Der 500 x 500 x 64 große hyperspektrale Datensatz wurde für die Hauptkomponentenanalyse genutzt. Die Daten wurden vor der Analyse zweifach spektral gemittelt. Zusätzlich wurde ein Savitzky-Golay-Filter mit Polynomen dritter Ordnung und 5 Stützstellen angewendet, um die Spektren zu glätten. Die Auswertung mittels Hypertools wurde für eine unterschiedliche Anzahl von Hauptkomponenten getestet. Die besten Ergebnisse wurden für 3 Hauptkomponenten erreicht. Die Ergebnisse sind links in Abbildung 5-16 dargestellt. Statt dem hyperspektralen TICO-Raman Datensatz mit 64 Kanälen stehen nun drei Kanäle zur Verfügung, die die einzelnen Hauptkomponenten darstellen und eine neue Linearkombination der initialen Daten bilden. Die einzelnen Kanäle der PCA wurden in das RGB-Farbmodell übertragen. Der rote Kanal wird durch die erste Hauptkomponente gebildet, die zweite Hauptkomponente entspricht dem grünen Kanal und die dritte Hauptkomponente dem blauen Kanal. Für einen besseren Vergleich ist rechts eine Durchlichtmikroskopieaufnahme³⁷ desselben FOV dargestellt, wobei der Überlapp nicht ideal ist und die rechte Aufnahme einen leicht links versetzten Bereich mit kleinerer Vergrößerung darstellt. Trotz des nicht identischen FOV lassen sich einige morphologische Merkmale in beiden Bildern erkennen. Im rechten unteren Bildrand ist ein Bereich ohne Ramansignal im PCA-Bild zu erkennen. Derselbe Bereich ist am rechten unteren Bildrand der Durchlichtmikroskopieaufnahme zu sehen. Die dominanteste Struktur ist im linken unteren Bildviertel der beiden Aufnahmen zu sehen. Im Durchlichtmikroskopiebild kann eine variierende Morphologie der Probe erkannt werden, die sich in den PCA-Ergebnissen wesentlich vielfältiger darstellt und aus einer Mischung der einzelnen Hauptkomponenten besteht. Auffällig ist, dass im rechten Bilddrittel der PCA-Ergebnisse kein Beitrag der ersten (roten) Hauptkomponente zu erkennen ist. Im selben Bereich ist eine granuläre Struktur in Grün dargestellt sowie das umgebene Gewebe in Blau. Die nahezu homogene Fläche im oberen Bereich der Durchlichtmikroskopieaufnahme zeigt auch für die PCA-Auswertung wenig Struktur.

³⁶ Download und weitere Informationen unter [HTTPS://WWW.HYPERTOOLS.ORG/](https://www.hypertools.org/)

³⁷ Das hochintensive Pumplicht wird im Probenarm durch mehrere Filter abgelenkt. Der Reflex wird abgeschwächt und teilweise durch eine Rasierklinge im Strahlengang teilweise abgeschattet. Der verbleibende Strahl wurde mit einer Photodiode aufgenommen. Die Brechungsindexvariation des Gewebes sorgt für leicht unterschiedliche Ablenkungen des Strahls bei der Aufnahme der TICO-Raman Daten, woraus das Durchlichtbild erzeugt wurde.

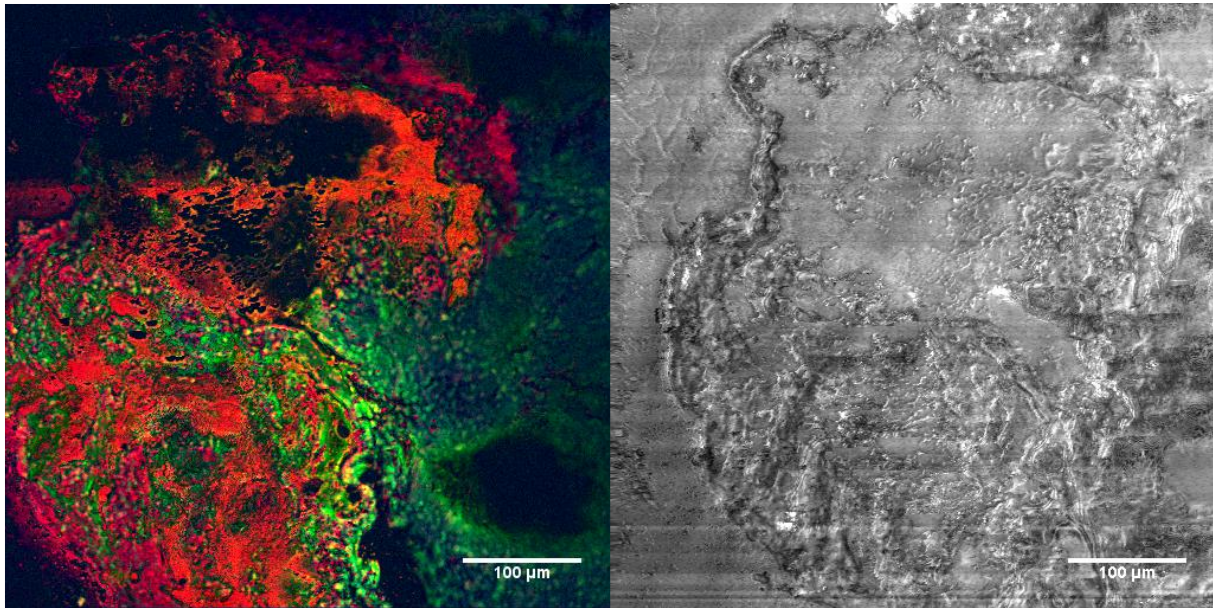


Abbildung 5-16 Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (engl. PCA) mit 3 drei Hauptkomponenten links, im Vergleich zu einer Durchlichtaufnahme desselben FOVs. Für die PCA wurde eine TICO-Raman Aufnahme mit 64 spektralen Punkten eines Gefrierschnitts der Nasenmuschel genutzt. Die drei ermittelten Hauptkomponenten wurde für das RGB-Farbmodell genutzt. Die Morphologie der Probe ist im Durchlichtbild zu erkennen und zeigt Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der PCA.

Die Ergebnisse der PCA führen zu einem Bild mit vielen Details und einer Vielzahl sich farblich abgrenzender Merkmale. Für einen besseren Vergleich werden die PCA-Ergebnisse mit der Auswertung unter Verwendung einzelner spektraler Kanäle verglichen.

In Abbildung 5-17 sind die Ergebnisse bei der Verwendung einzelner spektraler Kanäle für die Kontrastierung des Gewebes dargestellt. Wie zuvor sind Lipide in Rot über die Ramanbande bei 2850 cm^{-1} dargestellt. Die proteinreicheren Gewebeanteile in Grün sind über die Differenz aus dem Proteinkanal bei $2930\text{ cm}^{-1} - 2850\text{ cm}^{-1}$ errechnet worden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der PCA sind für die rote und grüne Hauptkomponente vergleichbare Anteile des Gefrierschnitts in Abbildung 5-17 (links) angefärbt worden. Da der dritte Kanal in dieser Repräsentation fehlt, geben die Ergebnisse der PCA einen detailreicheren Eindruck des Gewebes. Anteile des Gewebes, die durch mehrere Hauptkomponenten repräsentiert sind, können durch das additive RGB-Farbmodell identifiziert werden. Die Mischung der spektralen Information ist bei der Trennung von Lipid- und Proteinkanal unerwünscht. Als Folge wurden die getrennten Kanäle durch einen dritten spektralen Kanal erweitert. Die Ramanbande um 3010 cm^{-1} gehört zur $=\text{CH}$ -Streckschwingungen der ungesättigten Fettsäuren. Die Ergebnisse mit 3 spektralen Kanälen sind auf der rechten Seite in Abbildung 5-17 dargestellt. Im Vergleich zum Kontrast mit zwei spektralen Kanälen, sind keine neuen Strukturen der Probe durch den zusätzlichen Kanal sichtbar. Dennoch führt der zusätzliche Kanal zu einer detailreicheren Anfärbung des Gewebes. Es zeigt sich eine Abstufung in der Anfärbung durch die zusätzliche Ramaninformation im blauen Kanal, was für den hohen Anteil von $=\text{CH}$ -Molekülbindungen in den meisten Gewebeanteilen

spricht. Vergleicht man diesen Kontrast mit den PCA-Ergebnissen aus Abbildung 5-16, fällt auf, dass die Differenzierung der einzelnen Gewebeanteile durch die PCA den größten Detailreichtum aufweist.

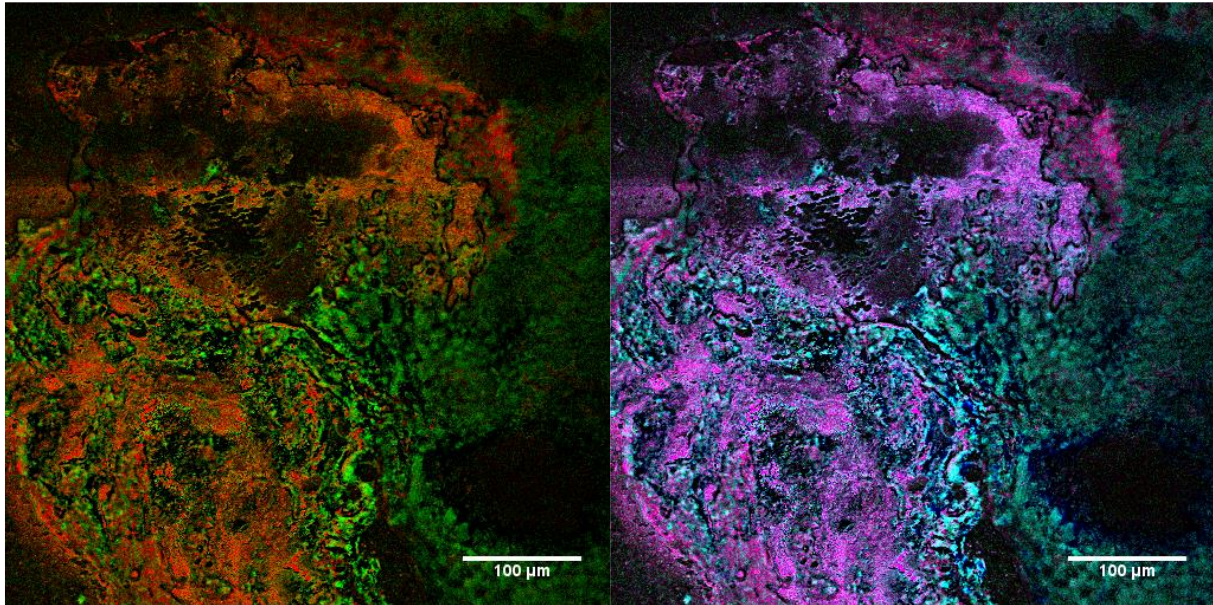


Abbildung 5-17 Gleicher TICO-Raman Datensatz aus Abbildung 5-16 ausgewertet ohne PCA. Die linke Seite repräsentiert in Rot lipidhaltige Strukturen um 2850 cm^{-1} , wohingegen der grüne Kanal proteinreichere Strukturen durch die Differenz aus $2935\text{ cm}^{-1} - 2850\text{ cm}^{-1}$ zeigt. Für die rechte Aufnahme wurde ein dritter spektraler Kanal (3010 cm^{-1}) genutzt, der den ungesättigten Fettsäuren entspricht ($=\text{CH}$ -Streckschwingung).

Neben der PCA gibt es eine Vielzahl von multivariaten Analysemethoden, die für die Auswertung von Ramanspektren genutzt werden. Mit großem Erfolg werden diese Methoden bereits in der spontanen Ramanspektroskopie eingesetzt [12, 13, 70, 114]. Im Bereich der stimulierten Ramanmikroskopie ist der sinnvolle Einsatz maßgeblich von der Anzahl aufgenommener spektraler Punkte abhängig. Systeme, die stimulierte Ramanspektren aufnehmen [22, 35, 41], haben durch die höhere Anzahl spektraler Punkte eine größere Datenbasis zur Verfügung, welche die Analysemethoden nutzen können. Eine weitere Klasse der Auswertungsmethoden bilden die neuronalen Netze, die im Bereich der stimulierten Ramanmikroskopie eingesetzt werden [24, 46, 115-117] und durch ihre Aktualität³⁸ einen Hinweis auf die gegenwärtigen Forschungsbemühungen geben. Nachteilig ist die Abhängigkeit von bereits gelabelten Trainingsdatensätzen, die im Vorfeld aufwendig erzeugt werden müssen. Deterministische Algorithmen wie die PCA benötigen keine gelabelten Datensätze, was den Einstieg in diese Auswerteverfahren vereinfacht. Die Verwendung der PCA auf den TICO-Raman Datensätzen soll daher als Einstieg in diese Auswertelgorithmen verstanden werden und einen Ausblick auf zukünftige Arbeiten geben.

³⁸ Alle genannten Veröffentlichungen wurden im Jahr 2019 (1), 2020 (3) und 2021 (1) publiziert.

Neben der Wahl der Datenauswertungsmethode ist die Qualität der Spektren ein wesentlicher Parameter eines SRS-Systems. Hierzu wurde eine TICO-Raman Aufnahme mit den Ergebnissen des spontanen Ramanmikroskops verglichen. Dargestellt in Abbildung 5-18 ist eine TICO-Raman Aufnahme mit 64 spektralen Punkten, die 10-fach gemittelt wurde. Das FOV beträgt $1000 \times 1000 \mu\text{m}$ mit 1000×1000 Pixeln. Zum Anfärben wurde der Lipidkanal in Rot und der Proteinkanal in Grün dargestellt. Die Pixelaufnahmezeit beträgt 1,56 ms mit einer Gesamtaufnahmedauer von 26 Minuten. Die Lesitung des FDML-Lasers betrug 5,3 mW mit 1,6 kW Spitzenleistung der Pumpulse. Die Signalhöhe beträgt $\sim 9 \text{ mV}$ mit einem SRG von $5,39 \times 10^{-4}$. Für den Vergleich der TICO-Raman Spektren (schwarz) wurden die zwei im oberen Bild markierten Positionen ausgewählt und mit dem spontanen Ramanmikroskop vermessen. Die beiden Pixel repräsentieren den roten (Lipide) bzw. grünen (Proteine) Anteil der Probe. Das spontane Ramanspektrum der beiden Punkte ist in Rot dargestellt. Betrachtet man beide Spektren für Punkt 1, fällt auf, dass die Ramanspektren nicht exakt zueinander passen. Die Maxima beider Spektren sind nicht deckungsgleich und haben einen Versatz von $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$. Des Weiteren fällt das spontane Spektrum links des Maximums schneller ab, wohingegen das TICO-Ramanspektrum ein Plateau aufweist bei $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$, welches übereinstimmt mit dem Lipid-Kanal der CH_2 -Molekülbindung.

Die spontanen Ramanspektren sind 5-fach gemittelt mit einer Gesamtaufnahmezeit von 25 s und 10 mW Anregungsleistung bei 532 nm. Die TICO-Raman Spektren wurden über eine 15×15 Pixel große ROI gemittelt, was zu einer Gesamtaufnahmezeit von 0,35 s führt und 71-fach schneller ist. Beide Spektren zeigen eine Ramanbande mit geringer Intensität um 3050 cm^{-1} . Die Position der Bande passt nicht zur $=\text{CH}$ -Molekülbindung in Lipiden, deren Ramanbande im Bereich von $3000\text{-}3015 \text{ cm}^{-1}$ liegt [66]. Die O-H und N-H-Streckschwingungen beginnen erst ab ca. 3200 cm^{-1} [66] und können für die Zuweisung ausgeschlossen werden. Polystyrol und Benzol weisen eine Ramanbande in diesem Bereich auf (CH-Molekülbindung), werden in Bezug auf biologische Ramanspektren aber nicht genannt. Es lässt sich eine Übereinstimmung für die Methylgruppe CH_3 mit einem zusätzlichem Halogenide (Chlorid, Bromid, Jod) finden [118]. Diese Interpretation konnte für Ramanspektren von biologischem Gewebe nicht bestätigt werden, sodass eine plausible Interpretation aktuell nicht gegeben werden kann.

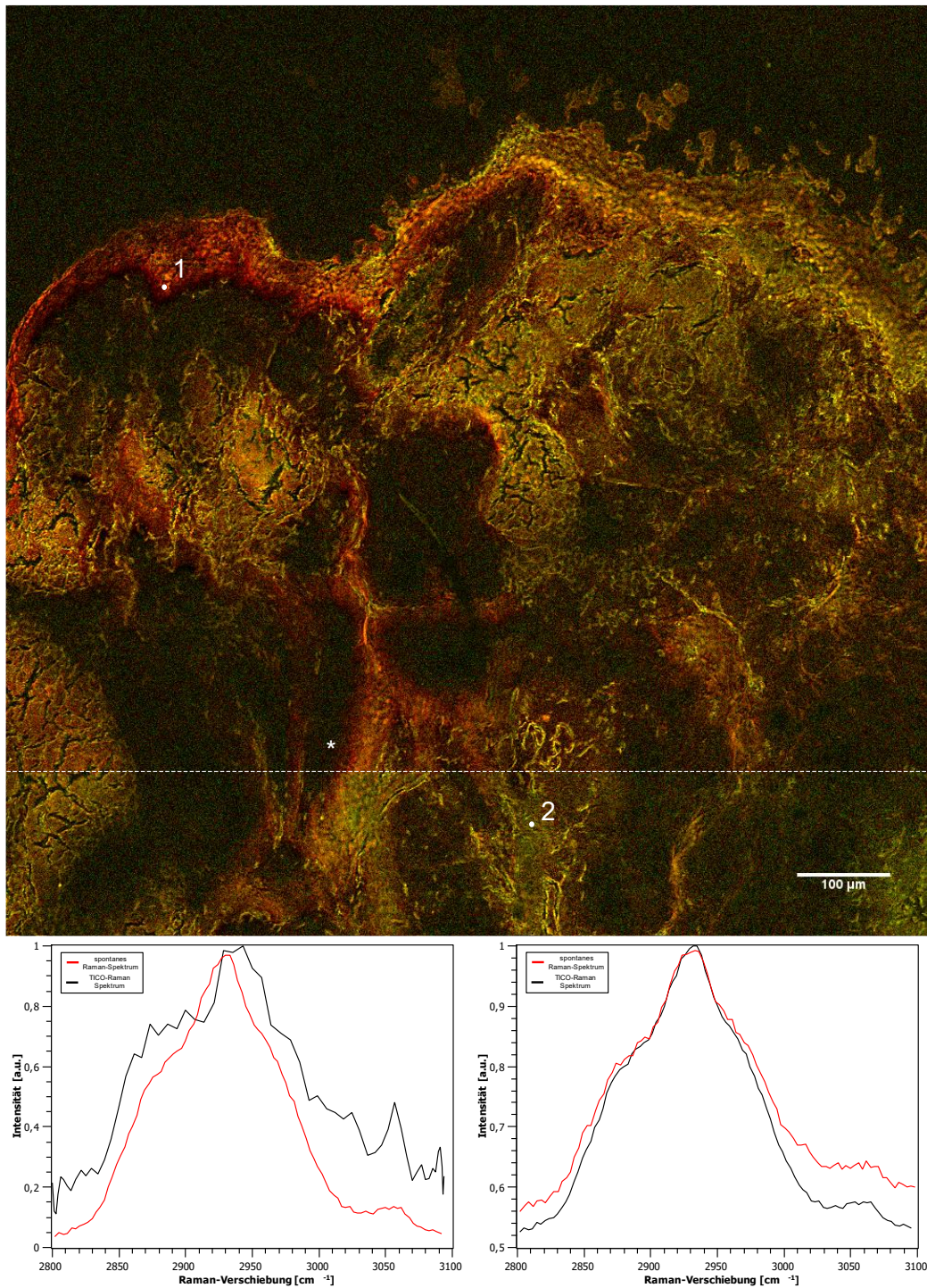


Abbildung 5-18 TICO-Raman Aufnahme eines Nasenmuschelgefrierschnitts. Grün stellt proteinreiches Gewebe bei 2935 cm⁻¹ dar und rote Strukturen lipidreiches Gewebe um 2870 cm⁻¹. Exemplarisch wurden zwei Punkte mit den Ergebnissen der spontanen Ramanspektroskopie verglichen. Die Spektren sind unter dem Bild dargestellt. Für den ersten Punkt ist ein höheres Rauschen des TICO-Ramanspektrums (schwarz), im Vergleich zum spontanen Ramanspektrum (rot) zu erkennen. Zudem zeigt das TICO-Raman Spektrum ein ausgeprägtes Plateau zwischen 2870-2900 cm⁻¹ im Vergleich zum spontanen Ramanspektrum. Für den zweiten Punkt (rechts) ist ein nahezu identischer spektraler Verlauf zwischen den Spektren erkennbar. Die horizontale Linie kennzeichnet eine Änderung der Fokusebene von 6 µm. Durch die geänderte Fokusebene ändert sich die Kontrastierung des Gewebes. Die Gewebestruktur rechts des Sterns ist oberhalb der Linie rötlich und kennzeichnet Lipide, wobei unterhalb der Linie dieselbe Struktur grünlich scheint, und proteinreiches Gewebe kennzeichnet.

Vergleicht man die TICO-Raman Spektren der beiden Punkte miteinander, fällt auf, dass das Spektrum für Punkt 1 mehr Rauschen aufweist als das TICO-Spektrum für Punkt 2, trotz gleicher Anzahl der gemittelten Pixel. Für Punkt 2 ist das spontane Ramanspektrum fast deckungsgleich zum TICO-Raman Spektrum. Die maximale Intensität liegt an derselben Wellenzahl (2934 cm^{-1}). Der direkte Vergleich zeigt, dass sich die aufgenommenen TICO-Raman Spektren mit den Ergebnissen des spontanen Ramanmikroskops decken.

Die gestrichelte horizontale Linie in Abbildung 5-18 markiert eine Änderung der z-Achse von $6\text{ }\mu\text{m}$ während der Aufnahme. Die Änderung der Fokusebene zeigt, dass sich für unterschiedliche Tiefen im Gewebeschnitt das Ramansignal ändert. Das Gewebe rechts des Sterns (*) in Abbildung 5-18 zeigt diese Änderung am eindeutigsten. Oberhalb der Linie ist das Gewebe rot, was für einen größeren Lipidgehalt spricht. Unterhalb der Linie erscheint die Struktur grünlich, mit einem höheren Proteinsignal. Die farbliche Änderung von Rot nach Grün ist auch am linken Bildrand zu erkennen, wobei die Umfärbung weniger deutlich ist. Das Gewebe wird an dieser Stelle homogener sein. Der sich ändernde Ramankontrast durch die Verschiebung der Fokusebene bestätigt, dass die Auswahl der Fokusebene einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse der Ramanbildgebung hat. Im aktuellen TICO-Aufbau wird die Fokusebene manuell über die Leistung des zurückreflektierten FDML-Lichts eingestellt. Ausgehend von dieser Startposition wird die Fokusebene anhand des Ramansignals während einer Testaufnahme optimiert. Für zukünftige Messungen, die mehrere Schnitte einer Biopsie qualitativ vergleichen sollen, muss eine konsistente Fokusebene gewährleistet sein. Anzumerken ist, dass beim Wechsel des Objektträgers die optimale Fokusebene nicht an derselben z-Position liegt und erneut die Fokusebene mit optimalen Ramansignal manuell gefunden werden muss.

5.2.3.2 Fingerprint TICO-Raman Aufnahmen

Neben den Ergebnissen für den CH-Streckbereich sollen erste Ergebnisse für die TICO-Ramanmikroskopie im Fingerprintbereich vorgestellt werden. Eine charakteristische Ramanbande des Fingerprintbereichs ist die Amide I Bande, die zwischen $1630\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ [66] liegt. Mithilfe der Amide I Bande lassen sich Aussagen über die Sekundärstruktur von Proteinen treffen. Dadurch wird die Informationsdichte der Ramanmessung erhöht. Für das spektrale Fenster von $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ wird ein FDML-Laser mit einer Zentralwellenlänge von 1290 nm genutzt. Die Pumpwellenlänge mit 1064 nm bleibt gleich. Die kleineren Ramansignale des Fingerprintbereichs erfordern einen möglichst rauscharmen Betrieb des FDML-Lasers im optimalen Arbeitspunkt (vgl. Abschnitt 4.2.2.1). Zum Zeitpunkt der Messung konnte dies für einen Bereich von $\sim 40\text{ nm}$ gewährleistet werden. Dieselben Gefrierschnitte wurden für die Ramanaufnahmen im Fingerprintbereich genutzt. Die Spitzenpumpleistung beträgt $1,3\text{ kW}$ und ist geringer im Vergleich zu den Aufnahmen im CH-Streckbereich. Die applizierbare FDML-Leistung hängt im Wesentlichen von der Qualität des FDML Lasers und der Balancierung ab. Die Erhöhung der Leistung des FDML-Lasers skaliert mit \sqrt{N} für das

Schrotrauschen. Für das relative Rauschen skaliert die Erhöhung der FDML-Leistung mit N , sodass eine Messung am Schrotrauschlimit der Messung mit einer höheren FDML-Leistung vorzuziehen ist. Es hat sich herausgestellt, dass für den verwendeten 1300 nm FDML-Laser eine Leistung von 3,8 mW das Optimum für die Messung am Schrotrauschlimit darstellt.

In Abbildung 5-19 (a) ist die TICO-Raman Aufnahme eines Gefrierschnitts im Fingerprintbereich von 1500-1800 cm^{-1} dargestellt. Das 500 x 500 μm große FOV wurde mit 500 x 500 Pixeln aufgenommen. Die Aufnahme ist 20-fach gemittelt mit einer Pixelintegrationszeit von 3,1 ms für 64 spektrale Punkte, was zu einer Integrationszeit von 48 μs für einen einzelnen spektralen Punkt führt. Andere SRS-Systeme, die im Fingerprintbereich messen, erreichen Pixelintegrationszeiten $\leq 10 \mu\text{s}$ für einen spektralen Punkt [41, 42, 48]. Als Folge ist das TICO-Raman System 5-10-fach langsamer für diese Aufnahme. Die längere Integrationszeit ist auf die geringe Probenleistung des FDML-Lasers von wenigen mW, im Vergleich zu den gepulsten Applikationen mit einer Durchschnittsleistung von ~ 100 mW auf der Probe [48] zurückzuführen. Die ca. 20-fach höhere Durchschnittsleistung führt zu einer Verbesserung des SNR mit $\sqrt{20} = 4,47$ (vgl. Gleichung 3-18). Diese Diskrepanz der SRS-Systeme wird für TICO-Raman durch die Mittelung mehrerer Aufnahmen kompensiert, was zu den längeren Aufnahmezeiten führt. Das SRG beträgt $2,5 \cdot 10^{-4}$, mit einer Signalhöhe von 3-4 mV.

Für die Kontrastierung des Gewebes wurden zwei spektrale Kanäle aus den TICO-Raman genutzt und im RGB-Farbmodell dargestellt. Der grüne Kanal wird durch den spektralen Bereich von 1540-1580 cm^{-1} gebildet. In diesem spektralen Bereich liegen Ramanbanden der Amino-Säure Tyrosin, der Nukleinsäuren Adenin und Guanin sowie Ramanbanden von NADH und des Hämoproteins [66]. Weitere Ramanbanden in diesem Bereich, die jedoch nur bei der resonanten Anregung beobachtbar sind, sind die Amide II Bande und das Ramansignal von Cytochromen [13]. Diese Vielzahl von möglichen Ramanbanden, in einem nur 40 cm^{-1} breiten spektralen Fenster, verdeutlichen die Informationsdichte des Fingerprintbereichs und erschweren eine eindeutige Interpretation der TICO-Ramandaten. Für den blauen Kanal aus Abbildung 5-19 wurde das spektrale Fenster zwischen 1630-1650 cm^{-1} genutzt. Dieser Bereich schließt die Amide I Bande ein. Für die Darstellung der genutzten spektralen Komponenten wurden die TICO-Raman Daten über zwei ROIs mit den Spektren des spontanen Raman-Mikroskops verglichen (vgl. (b) und (c) in Abbildung 5-19). Es ist anzumerken, dass für den Vergleich nicht derselbe Gewebeschnitt zur Verfügung stand und daher ein anderer Schnitt derselben Biopsie für die Aufnahme der spontanen Ramanspektren genutzt wurde. Die spontanen Spektren wurden mit der Anregungswellenlänge von 532 nm und 10 mW auf der Probe aufgenommen. Das 600 l/mm Gitter und die konfokale Blende von 100 μm resultieren in einer spektralen Auflösung³⁹ von 2,5 cm^{-1} . Die Gesamtintegrationszeit eines spontanen Ramanspektrums beträgt 50 Sekunden. Die TICO-Raman

³⁹ Die spektrale Auflösung für das spontane Ramanmikroskop wurde aus dem Parameterdatensatz der Aufnahme entnommen und ist nicht berechnet worden.

Spektren wurden über die eingezeichneten ROIs (15 x 15 Pixel) gemittelt, was zu einer Integrationszeit von 698 ms führt und ca. 72-fach schneller ist als das spontane Ramanmikroskop. Die TICO-Raman Spektren wurden zusätzlich Savitzky-Golay gefiltert mit vier Nachbarschaftspunkten und Polynomen zweiter Ordnung. Vergleicht man die Spektren in (b) aus Abbildung 5-19, fällt auf, dass der spektrale Verlauf beider Spektren vergleichbar ist, aber die Lage der Maxima nicht deckungsgleich ist. Außerdem ist das TICO-Raman Spektrum spektral breiter. Möglicherweise ist das Mitteln über die ROI für die größere spektrale Breite verantwortlich. Die beiden Spektren in (c) zeigen eine andere spektrale Signatur, im Vergleich zu den Spektren aus (b). Hier liegt das charakteristischste Ramansignal bei 1644 cm^{-1} und entspricht der Amide I Bande in einer α -Helix Struktur [119].

Obwohl für die Kontrastierung im RGB-Farbmodell der grüne und blaue Kanal genutzt wurde, dominieren neben den grünlichen Strukturen Cyan gefärbte Anteile, die eine Mischung des grünen und blauen Kanals darstellen. Bereiche, die ein Amide I Signal zeigen, weisen gleichzeitig ein Signal zwischen $1540\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ auf, wie die Spektren über die beiden ROIs zeigen. Im Gegensatz dazu gibt es grüne Bereiche, in denen kein Amide I Signal vorliegt. Eine Zuweisung der einzelnen Gewebeanteile anhand eines 300 cm^{-1} breiten Ramanspektrums ist ohne große Datenbasis und Vergleichsfärbungen erschwert. Spontane Ramanspektren, die in diesem spektralen Fenster sich mit den TICO-Raman Daten decken, können genutzt werden, um eine erste Einschätzung zugeben.

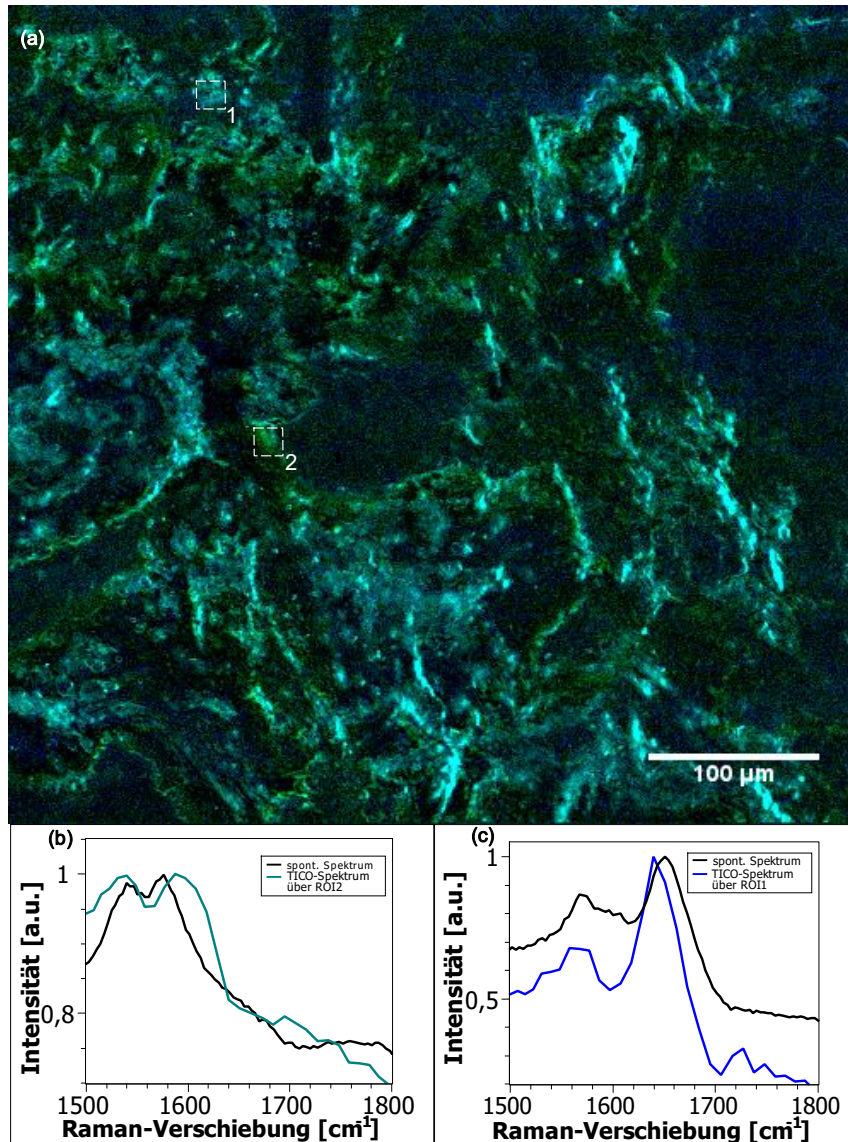


Abbildung 5-19 TICO-Raman Aufnahme im Fingerprintbereich von einem Nasenmuschelgefrierschnitt. Die Kontrastierung nutzt zwei spektrale Kanäle im RGB-Farbmodell. Der grüne Kanal ist das integrierte Ramansignal von 1540-1580 cm^{-1} , in der Ramanbanden von Nuklein- und Aminosäuren liegen. Der blaue Kanal wird aus dem Ramansignal von 1640-1650 cm^{-1} gebildet und stellt die Amide I Ramanbande in α -Helix Struktur dar. Die eingezeichneten ROIs repräsentieren die zwei unterschiedlichen spektralen Signaturen die unter dem Bild in (b) und (c) gezeigt sind. Validiert wurden die TICO-Raman Daten mit der Aufnahme von spontanen Ramanspektren desselben Gewebes. Die Cyan eingefärbten Strukturen in (a) haben ein Ramansignal in beiden spektralen Kanälen. Die TICO-Raman Daten zeigen leichte Abweichungen von den spontanen Ramanspektren für beide Kanäle, wobei eine klare spektrale Ähnlichkeit zuerkennen ist.

5.2.3.3 Spontane Ramanspektroskopie und PCA-Analyse

Dargestellt in Abbildung 5-20 sind zwei spontane Ramanspektren von Nasenmuschel-Gewebe, die charakteristisch sind für die gewählten spektralen Kanäle der Fingerprint TICO-Raman Aufnahme in Abbildung 5-19. Die Aufnahmeparameter entsprechen den zuvor bereits genannten Parametern der Spektren aus Abbildung 5-19. Die Interpretation der gemessenen Ramanbanden ist aus [66] entnommen, wenn sie nicht anders benannt sind.

Im spektralen Bereich um 740 cm^{-1} liegen Ramanbanden der Ringstrukturen von DNS und RNS Basen [66]. Die Ramanbande bei 991 cm^{-1} wird im Zusammenhang mit der C-O Bindung von Ribose genannt. Für 1124 cm^{-1} werden Protein assoziierte Ramanbanden der C-C und C-N Molekülbindungen genannt. Diese Ramanbande ist in den anderen Gewebearten nicht aufgetreten und ist im grünen Spektrum stärker ausgeprägt. Betrachtet man die anderen Ramanbanden, sind charakteristische Merkmale eines Gewebespektrums im blauen Spektrum erkennbar: Die Amide III Bande um 1300 cm^{-1} ist, neben der CH_2 Scherschwingung um 1450 cm^{-1} sowie der Amide I Bande bei 1647 cm^{-1} , klarer Indikator eines Gewebespektrums. Diese charakteristischen Banden fehlen im grünen Spektrum, was ein biologisches Spektrum jedoch nicht ausschließt. Die Ramansignatur von $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ des grünen Ramanspektrums enthält mehrere Ramanbanden, die für Collagen und Nukleinsäuren sprechen – 1307 cm^{-1} CH_3 und CH_2 Drehschwingung (engl. twisting) [120], CH_3 und CH_2 Wippschwingung (engl. wagging) der Purin-Basen in Nukleinsäuren bei 1328 cm^{-1} [120], CH_3 und CH_2 „wagging“ der Nukleinsäuren und Collagen bei 1335 cm^{-1} , die CH_3 und CH_2 -Deformationsschwingung in Collagen [121] und die symmetrische CH_3 -Streckschwingung bei 1386 cm^{-1} [119]. Der charakteristische Bereich zwischen $1540\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$, der in den TICO-Raman Aufnahmen abgetastet wurde, ist bereits zuvor diskutiert worden (Tyrosin, A, G, NADH, Hämoprotein).

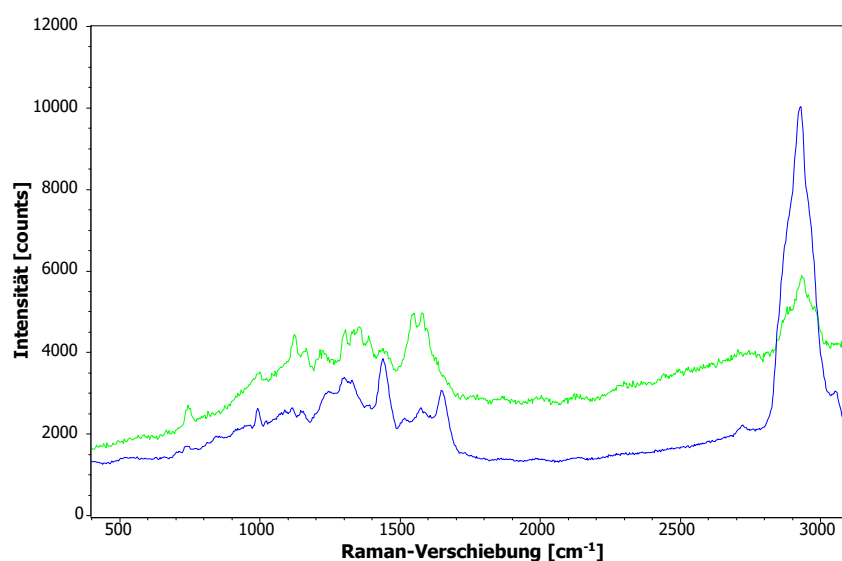


Abbildung 5-20 Charakteristische spontane Ramanspektren des Nasenmuschel-Gewebes. Das blaue Spektrum entspricht dem Amide I haltigen Gewebe derselben Biopsie aus Abbildung 5-19. Das grüne Spektrum ist analog zu den grünen Anteilen der verwendeten Gewebebiopsie aus Abbildung 5-19 entstanden.

Die Unterschiede der Ramanspektren sind auch außerhalb des spektralen Fensters von 300 cm^{-1} sichtbar. Entsprechend kann eine größere spektrale Abdeckung des TICO-Systems zu einem komplexeren Kontrast mit mehreren Farbkanälen führen.

Eine weitere Möglichkeit, die Auswertung der TICO-Raman Daten zu verbessern, ist die bereits vorgestellte PCA-Analyse. Aufgrund der charakteristischen Ramanstruktur im Fingerprint-Bereich wurde die PCA für drei Hauptkomponenten angewendet. Zuvor wurden die Daten zweifach spektral gemittelt und Savitzky-Golay gefiltert mit Polynomen dritter Ordnung und 5 Stützstellen. Die Ergebnisse der PCA sind in Abbildung 5-21 dargestellt und sind aus demselben TICO-Raman Datensatz entstanden wie die Ergebnisse in Abbildung 5-19. Die einzelnen Hauptkomponenten wurden im RGB-Farbmodell dargestellt. Hauptkomponente 1 (HK1) zeigt eindeutig die Amide I Ramansignatur und entspricht den roten Strukturen in Abbildung 5-21. Sowohl die roten Strukturen als auch die Darstellung in Graustufen von HK1, entsprechen den Cyan farbigen Anteilen der Probe in Abbildung 5-19. Die zweite Hauptkomponente (HK2) wird durch die grünen Anteile repräsentiert und zeigt Gemeinsamkeiten zu den grünen Anteilen der TICO-Aufnahme in Abbildung 5-19. Das Spektrum von HK2 zeigt keine Gemeinsamkeiten mit den TICO-Raman Spektren. Derselbe Zusammenhang gilt für die dritte Hauptkomponente (HK3), die durch die blauen Anteile repräsentiert wird. Das ins Negative verlaufende Spektrum von HK3 zeigt Ähnlichkeiten zu den Hauptkomponenten, die in anderen Arbeiten publiziert wurden [122, 123]. Die drei HK zeigen, dass die PCA eine höhere Separation der TICO-Daten liefern kann, die gefundenen Spektren sich jedoch nicht mit den Spektren der Rohdaten decken. Inwiefern es sich bei den Ergebnissen der PCA um echte Ramaninformationen handelt, muss in zukünftigen Experimenten evaluiert werden.

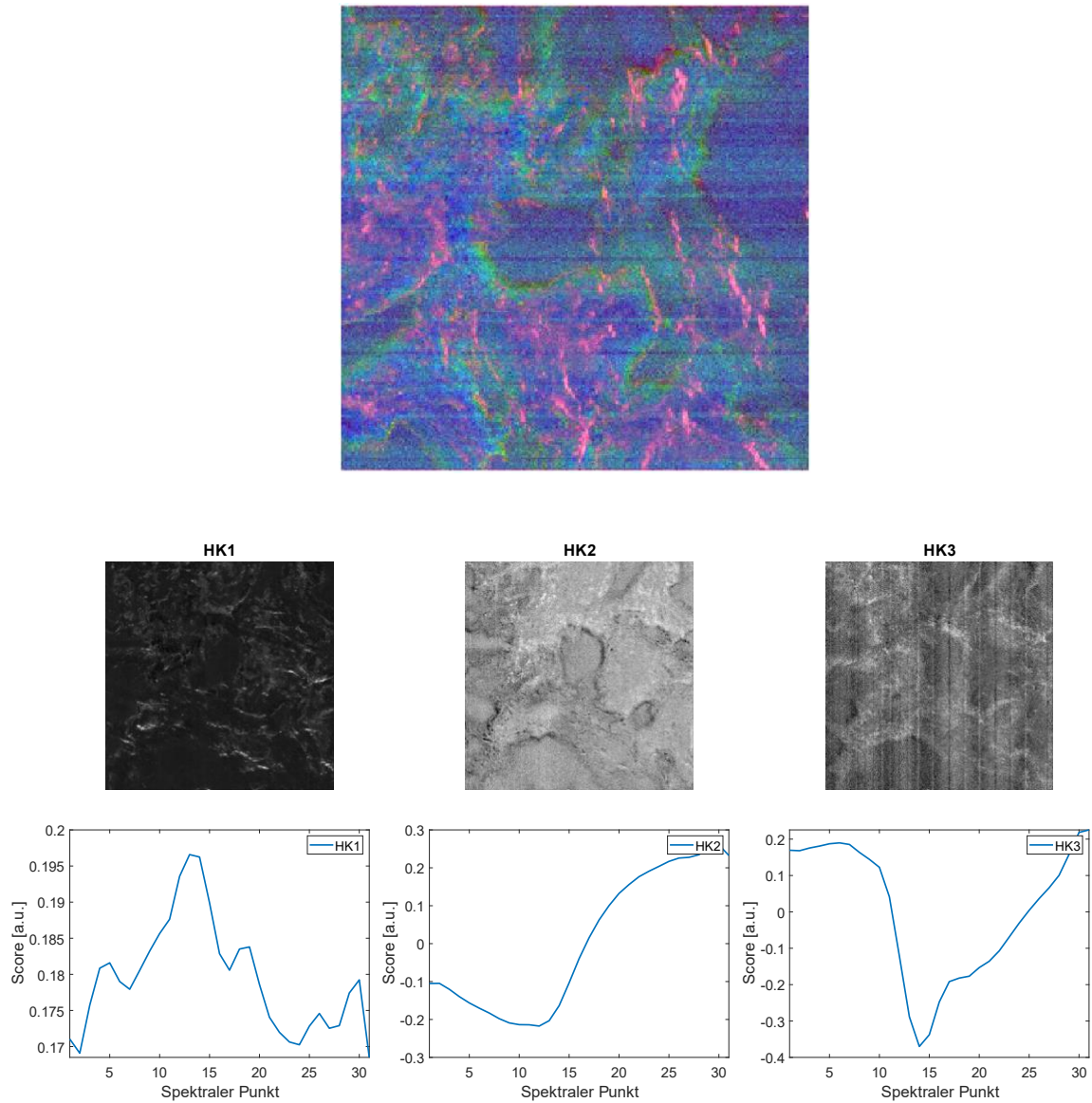


Abbildung 5-21 PCA-Analyse der Fingerprint TICO-Raman Daten aus Abbildung 5-19 mit drei Hauptkomponenten (HK). Zuvor wurden die Daten zweifach spektral gemittelt sowie Savitzky-Golay gefiltert mit Polynomen dritter Ordnung und 5 Stützstellen. Die Ergebnisse der drei HK sind oben im RGB-Farbmodell dargestellt. Als Graustufenbild, mit zugehörigem Spektrum, sind darunter die drei HK abgebildet. Die rote HK entspricht klar den Strukturen mit Amide I Ramansignal aus Abbildung 5-19, wie das Spektrum unter HK1 zeigt. HK2 zeigt Ähnlichkeiten zu den grünen Strukturen aus Abbildung 5-19, wobei das repräsentative Spektrum unter HK2 keine Ähnlichkeit zeigt. Derselbe Zusammenhang gilt für den blauen Kanal, dargestellt durch HK3. Das repräsentative Spektrum zeigt jedoch Ähnlichkeiten zu PCA-Analysen anderer Publikationen [122, 123].

Im Vergleich zu den PCA-Ergebnissen der Nasenmuschel des CH-Streckbereichs ist die Bildqualität deutlich schlechter durch das geringere Ramansignal. Im Allgemeinen bietet der Fingerprintbereich eine höhere Anzahl disjunkter Ramanbanden, die sich für unterschiedliche Gewebestrukturen der Nasenmuschel unterscheiden und einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere TICO-Raman Messungen bieten. Die spektrale Abdeckung des gesamten Fingerprintbereichs mittels TICO-Raman wurde bereits in [56] für eine Mischung aus Toluol, Benzol und Cyclohexan gezeigt und benötigt unterschiedliche Pumpwellenlängen und FDML-Laser. Dieselbe Funktionalität für die Messung ganzer TICO-Raman Bilder mit Millionen von Spektren umzusetzen, bedarf einiger Anpassungen des TICO-Systems. Für niedrigere Wellenzahlen nähern sich Pump- und Abtast-Wellenlänge an, sodass einerseits die optischen Filter getauscht und andererseits die chromatischen Aberrationen der Fokusslinsen bei der Verwendung großer Wellenlängenbereiche kompensiert werden müssen. Zusätzlich müssen zwei FDML-Laser genutzt und balanciert werden, was die Komplexität zusätzlich erhöht.

Abschließend soll das Nasenmuschelgewebe als mögliche Ramanprobe für weitere Anwendungen beurteilt werden. Die Signalstärke war im CH-Streckbereich ausreichend hoch, um Pixelintegrationszeiten von 430 μs umzusetzen bei der Verwendung von 8 spektralen Punkten. Eine 10-fache Mittelung der Daten hat ausgereicht, um Spektren ausreichender Qualität für den Vergleich mit spontanen Ramanspektren zu erzeugen. Die Pixelintegrationszeit für einen einzelnen spektralen Punkt beträgt somit 24 μs . Vergleichbare SRS-Systeme erreichen im CH-Streckbereich Integrationszeiten von 1-12,5 μs [23, 35, 92, 124, 125], was das TICO-Raman System 2-24-fach langsamer macht. Wie bereits zuvor angesprochen, muss die geringe Probenleistung im TICO-Ramansystem durch häufigeres Mitteln kompensiert werden. Im Fingerprintbereich sind die Integrationszeiten im Allgemeinen länger, wobei das TICO-Raman System hier nur 5-10-fach langsamer ist als andere SRS-Systeme [41, 42, 48].

Ein wesentlicher Schritt für die Prozessierung der TICO-Daten ist durch die vorgestellte PCA-Analyse gegeben. Im CH-Streckbereich sowie auch im Fingerprintbereich konnten mithilfe der PCA Ramankontraste erzeugt werden, die über die Kontrastierung durch einzelne spektrale Fenster hinausgehen. Die gefundenen Spektren der einzelnen Hauptkomponenten decken sich nicht immer mit den Rohdaten, liegen aber für dieselben Strukturen im Bild vor. Komplexe Auswertalgorithmen, die in der Lage sind, den vollen Informationsgehalt der TICO-Raman Daten zu nutzen, werden in zukünftigen Arbeiten eine wesentliche Rolle spielen.

5.2.4 Hypopharynxkarzinom

Die zweite Gewebeart des Nasen- und Rachenraums sind Nadelbiopsien der Hypopharynx. Die Schichtdicke der Gefrierschnitte beträgt 20 μm und wurde von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Lübeck) zur Verfügung gestellt. Alle Patienten wurden in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, behandelt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Universität Lübeck (Genehmigungsnummer 16-278) genehmigt und in Übereinstimmung mit den in der WMA-Deklaration von Helsinki formulierten ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung durchgeführt.

Die Hypopharynx stellt den unteren Teil des Rachens dar und erstreckt sich von der Oberkante des Kehledeckels bis zur Höhe des Ringknorpels des Kehlkopfes. Die Hypopharynx ist mit einer Schleimhaut ausgekleidet. Ein häufiges Krankheitsbild sind Plattenepithelkarzinome durch Alkohol- und Nikotinmissbrauch [126]. Die verwendeten Gefrierschnitte stammen von tumorösen Gewebe und ermöglichen somit die Bildgebung an krankem Gewebe.

5.2.4.1 TICO-Raman Aufnahmen im CH-Streckbereich

Abbildung 5-22 stellt eine Aufnahme im CH-Streckbereich dar. Der spektrale Bereich von 2757 - 3056 cm^{-1} wurde mit 64 spektralen Punkten abgetastet. Die genutzte Spitzenleistung der Pumpulse beträgt 1,6 kW. Die Abtastleistung des FDML-Lasers betrug 5,7 mW. Die Aufnahme ist 10-fach gemittelt und deckt einen Bereich von 500 x 500 μm mit 500 x 500 Pixeln ab. Die Pixelintegrationszeit für 64 spektrale Punkte beträgt $\sim 1,5$ ms, mit einer Integrationszeit von 24 μs für einen einzelnen spektralen Punkt. Die TICO-Raman Daten wurden Savitzky-Golay gefiltert mit 5 Stützstellen und Polynomen 2. Ordnung. Drei spektrale Kanäle wurden für das RGB-Farbmodell genutzt: Lipide sind rot dargestellt und entsprechen dem Ramansignal bei 2855 cm^{-1} . Proteinreiches Gewebe ist grün eingefärbt und repräsentiert das Ramansignal bei 2923 cm^{-1} . Der blaue Kanal entspricht der =CH Molekülbindung in Lipiden und wird durch das Ramansignal von 3010-3015 cm^{-1} gebildet. Beispiele für die spektrale Signatur der einzelnen Gewebeanteile sind rechts neben der TICO-Raman Aufnahme in Abbildung 5-22 dargestellt. Die einzelnen Spektren wurden, an den passend zur Farbe der Spektren eingefärbten Pfeilen, aus den TICO-Daten gebildet. Für eine optimale Beurteilung des spektralen Verlaufs wurden die Daten normiert. Das aufgenommene FOV zeigt den Rand der Probe. Das SNR der Aufnahme beträgt 7,55 mit einem SRG von $6,46 \cdot 10^{-4}$. Vergleicht man die Spektren der Nasenmuschel mit den Spektren der Hypopharynx fallen kleine Abweichung der Bandenlage von 10-20 cm^{-1} auf. Hieraus lassen sich durch die kleine Datenbasis und dem Fehlen von Vergleichsfärbungen keine allgemeingültigen Aussagen für die Unterscheidung zwischen gesundem und krankhaftem Gewebe ableiten. Das Ziel dieser Arbeit ist, den Einsatzbereich von TICO-Raman zu erweitern und zu untersuchen, welche Gewebeproben für mögliche Anwendungen geeignet sind und welche Aufnahmeverfahren am vielversprechendsten sind.

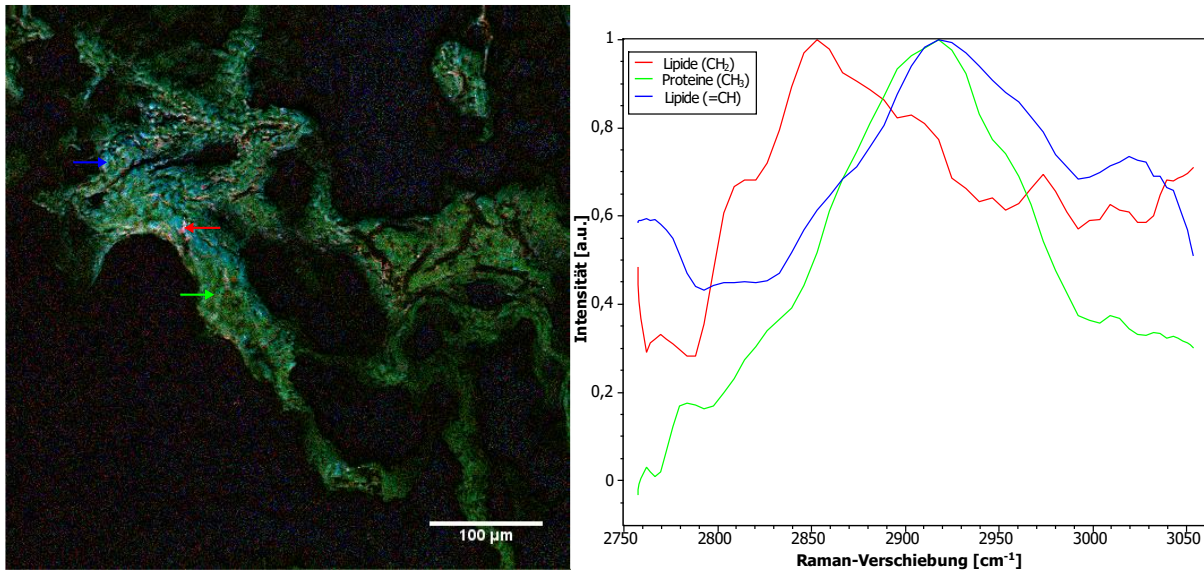


Abbildung 5-22 TICO-Raman Aufnahme mit 64 spektralen Punkten eines Hypopharynxkarzinoms im CH-Streckbereich von $2757\text{-}3056\text{ cm}^{-1}$. Der Ramankontrast zeigt drei spektrale Kanäle, wobei rote Strukturen das Lipidsignal bei 2855 cm^{-1} kennzeichnen und grüne Strukturen dem Ramansignal bei 2923 cm^{-1} entsprechen. Die blauen Anteile entsprechen dem Signal im spektralen Fenster von $3010\text{-}3015\text{ cm}^{-1}$. Die farbigen Pfeile im Bild geben die Position der zugehörigen TICO-Raman Spektren gleicher Farbe an.

Eine weitere Aufnahme derselben Tumorbiopsie wurde für die Darstellung des Lipid-Protein-Kontrasts ausgewertet und ist in Abbildung 5-23 dargestellt. Neben dem Bild sind Beispielspektren für die zwei Gewebeanteile abgebildet. Die Daten sind normiert und sollen lediglich die Ramansignatur wiedergeben. Das rote Spektrum hat ein höheres Ramansignal bei 2870 cm^{-1} sowie bei $\sim 3015\text{ cm}^{-1}$, was für ein Lipidspektrum spricht. Das grüne Spektrum zeigt im Wesentlichen das Proteinsignal bei 2920 cm^{-1} . Die Farbe der TICO-Raman Spektren entspricht den farblichen Strukturen links im Bild (Proteine in grün, Lipide in rot). Die Aufnahmeparameter sind identisch zur vorherigen Aufnahme aus Abbildung 5-22. Proteinreiche Strukturen mit hohem Ramansignal führen zu einem SRG von $6,09 \cdot 10^{-4}$, vergleichbar mit der Aufnahme zuvor. Innerhalb des Gewebes sind größere Bereiche ohne Ramansignal vorhanden. Rote Strukturen sind nicht flächig vorhanden und begrenzen oftmals einzelne grünliche Bereiche. Hierbei könnte es sich um lipidhaltige Membrane im Gewebe handeln.

Die gezeigten Aufnahmen mit 64 spektralen Punkten nutzen wenige spektrale Punkte des hyperspektralen Datensatzes, wobei in den Aufnahmen 3 spektrale Punkte für jeden Farbkanal gemittelt wurden und die restlichen spektralen Punkte für den Ramankontrast ungenutzt bleiben. Hierdurch wird die Aufnahmezeit verlängert und die Probe unnötig durch die längere Exposition mit dem hochintensiven Pumplicht belastet.

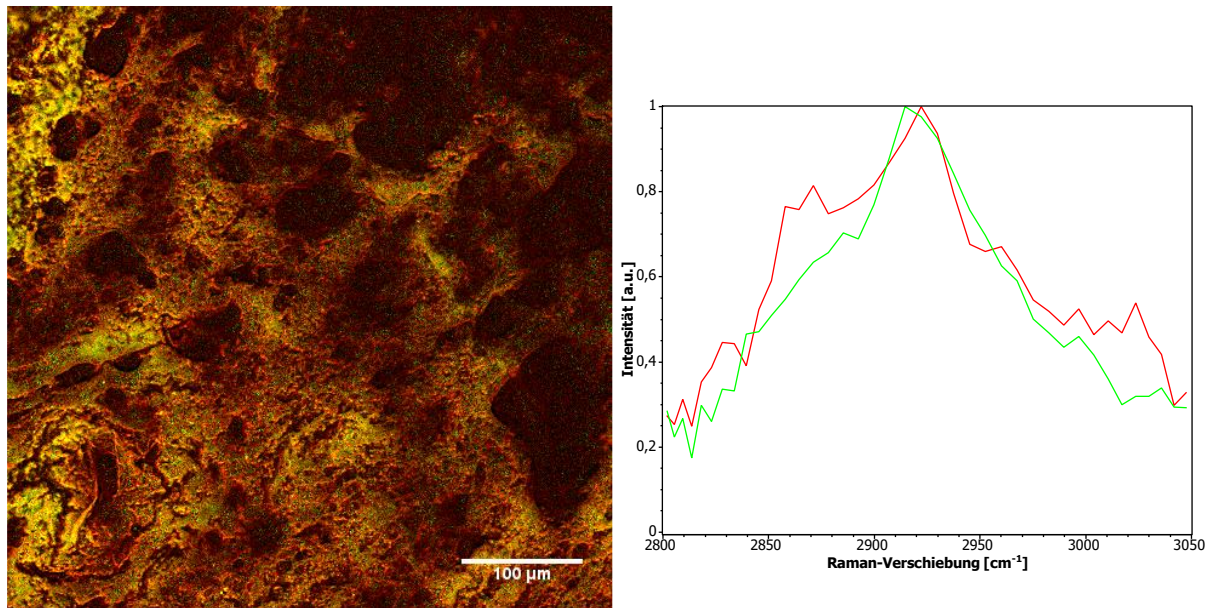


Abbildung 5-23 Ramankontrast durch Differenzbildung des Lipid- (hier 2870 cm^{-1}) und Proteinkanals ($\sim 2920\text{ cm}^{-1}$). Lipidreiche Strukturen sind rot, proteinreiche Strukturen grün gefärbt. Es wurden jeweils drei spektrale Punkte für die Kanäle gemittelt. Das rote Spektrum zeigt die Signatur von Lipiden, wie das höhere Signal bei 2870 cm^{-1} und $\sim 3015\text{ cm}^{-1}$ bestätigt. Die grünen Strukturen treten flächiger auf und werden teilweise durch die roten Anteile eingegrenzt, sodass es sich um Lipid-Membrane handeln könnte.

Als Folge wurde das Sparse Sampling Konzept für die Aufnahme der TICO-Raman Daten auf den tumorösen Gefrierschnitten angewendet. Dargestellt in Abbildung 5-24 ist dasselbe FOV, ($500 \times 500\text{ }\mu\text{m}$, $500 \times 500\text{ Pixel}$, $1,6\text{ kW}$ Pumpulse, $5,2\text{ mW}$ FDML-Leistung) aufgenommen mit 64 spektralen Punkten links und in Sparse Sampling Konfiguration mit 6 spektralen Punkten rechts. Der Kontrast wurde über die spektralen Punkte der Wellenzahlen 2840 cm^{-1} (rot) und 2930 cm^{-1} (grün) für den Lipid-Protein-Kontrast genutzt. Beide Aufnahmen sind 40-fach gemittelt, mit einer Pixelintegrationszeit von $6,24\text{ ms}$ für 64 spektrale Punkte und $672\text{ }\mu\text{s}$ für die Aufnahme von 6 spektralen Punkten, was eine $\sim 9,5$ -fache schnellere Aufnahme, bei gleichzeitiger Erhaltung der Bildinformation erlaubt. Die Leistungsparameter sind mit den vorherigen Aufnahmen der Hypopharynx identisch. Auch das SRG liegt im Bereich von $\sim 6 \times 10^{-4}$. Auf der Basis der TICO-Raman Aufnahme mit 64 spektralen Punkten können die spektralen Punkte größter Aussagekraft für Sparse Sampling genutzt werden. Die schnellere Bildgebung bei der Verwendung von Sparse Sampling ermöglicht die Aufnahme größerer Bildfelder im selben Zeitraum, wie bei der Aufnahme mit 64 spektralen Punkten.

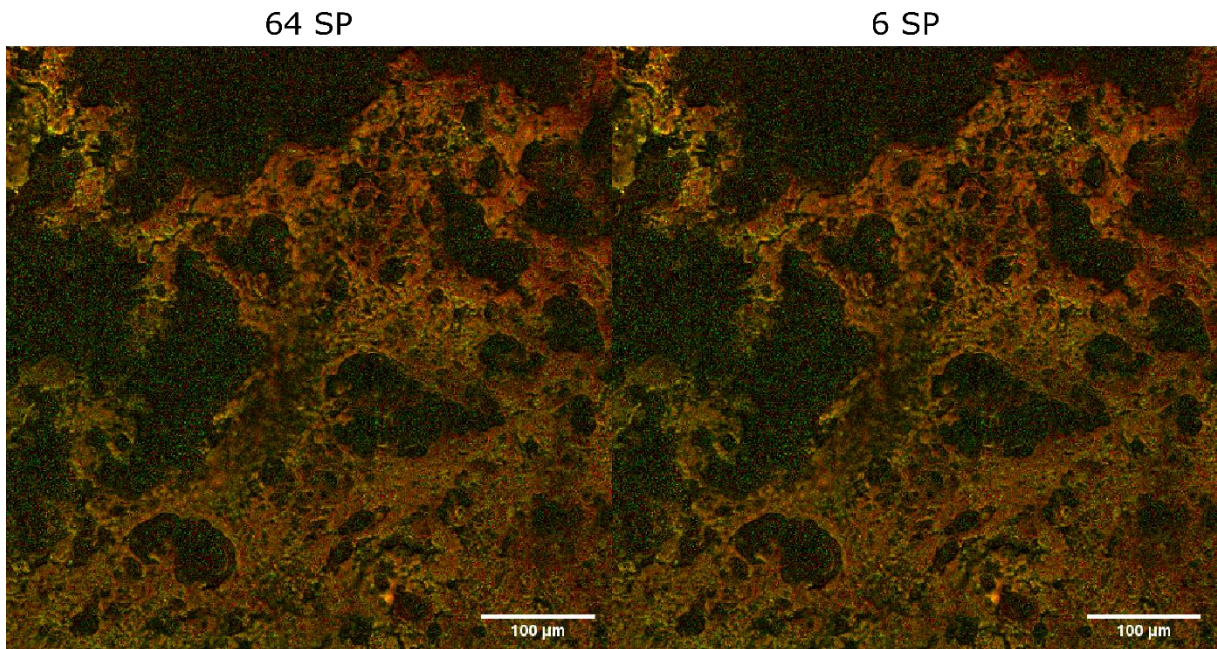


Abbildung 5-24 Vergleich zweier TICO-Raman Aufnahmen aufgenommen mit 64 und 6 spektralen Punkten in Sparse Sampling Konfiguration. Die Aufnahme deckt ein FOV von (500 x 500 μm , 500 x 500 Pixel) ab, ist 40-fach gemittelt und wurde mit identischen Laserparametern aufgenommen. Es wurde dieselbe Anzahl spektraler Punkte mit identischer Wellenzahl für die Kontrastierung genutzt. Die Pixelaufnahmezeit sinkt um das 9,3-fache von 6,24 ms auf 672 μs bei der Verwendung von Sparse Sampling.

Somit wurde derselbe Gefrierschnitt mit 6 spektralen Punkten in einem Bereich von 1000 x 1000 μm mit 1000 x 1000 Pixeln aufgenommen (Vgl. Abbildung 5-25). Das zuvor aufgenommene FOV liegt innerhalb des weißen Rahmens. Die Gesamtaufnahmezeit der 40 Millionen Ramanspektren mit 6 spektralen Punkten beträgt 9,6 Minuten. Es wurden dieselben Laserparameter und spektralen Punkte für den Ramankontrast verwendet. Der Ramankontrast ist durch grüne Anteile dominiert, mit einem größerem Ramansignal bei 2930 cm^{-1} . Die Morphologie der Probe bleibt auch bei der Aufnahme eines größeren FOV erhalten: Ein homogenes Gewebe ist nicht erkennbar. Es sind viele runde Strukturen ohne Ramansignal im Gewebe vorhanden.

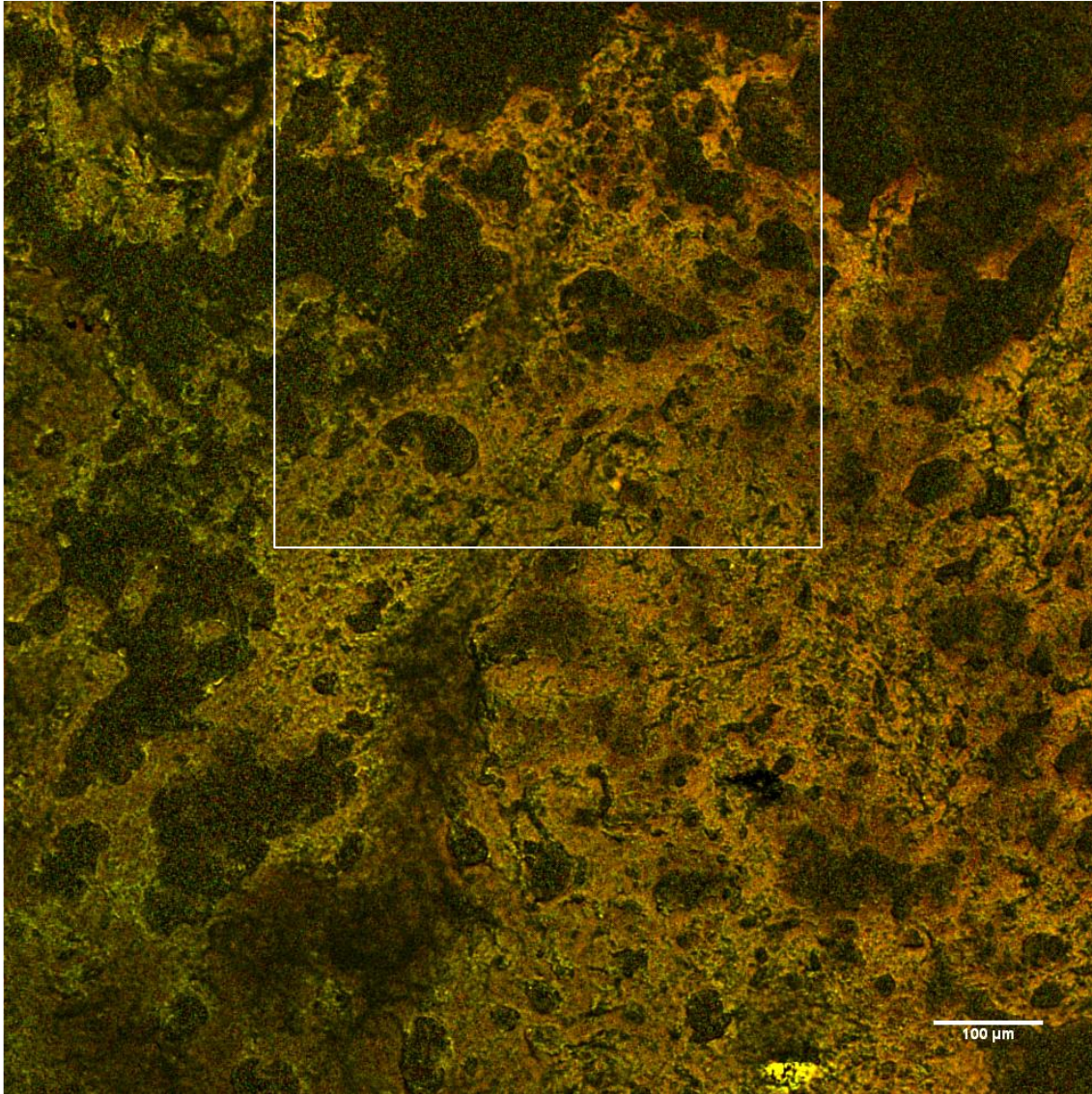


Abbildung 5-25 Sparse Sampling TICO-Raman Aufnahme mit 6 spektralen Punkten für ein $1000 \times 1000 \mu\text{m}$ großes FOV mit 1000×1000 Pixeln. Der weiße Rahmen zeigt das FOV aus Abbildung 5-24. Sparse Sampling ermöglicht die Abtastung großer Bildbereiche bei gleichzeitiger Erhaltung der Bildqualität. Die Gesamtaufnahmezeit der 40 Millionen Spektren beträgt ~9,6 Minuten. Trotz des großen Bildfelds konnte keine andere Morphologie in der Probe beobachtet werden.

Sich durch ihre Morphologie abgrenzende Strukturen wurden zuvor in allen Gewebearten gefunden, sodass die Messung eines weiteren Gewebeschnitts derselben Biopsie durchgeführt wurde. Der Tumor liegt als Serienschnitt vor, sodass 4 Schnitte übersprungen wurden und der neue Gefrierschnitt eine um $80 \mu\text{m}$ verschobene Ebene der Biopsie darstellt. Anders als in Abbildung 5-25 lassen sich in Abbildung 5-26 zwei Gewebestrukturen erkennen. Neben dem inhomogenen Anteil der Probe, mit vielen rundlichen Strukturen, ist ein homogener Anteil erkennbar. Innerhalb dieses Bereiches zeichnen sich feine längliche Strukturen mit weniger Ramansignal ab. Die TICO-Raman Aufnahme wurde mit 64 spektralen Punkten, ist 10-fach gemittelt und mit identischen Laserparametern aufgenommen worden. Das Epithel der Hypopharynx besteht aus einem unverhornten Plattenepithel. Unter dem Epithel liegen vor allem muköse Drüsen, um die zu schluckenden Speisen gleitfähig zu machen, sowie lymphatisches

Gewebe. Bei der homogenen Struktur im linken Bildbereich könnte es sich um das Plattenepithel handeln, wobei die restliche Struktur entweder aus mukösen Drüsen oder lymphatischem Gewebe besteht [90]. Eine genaue Beurteilung ist erschwert, da für die verwendeten Biopsien keine Vergleichsfärbungen vorliegen. Für zukünftige Anwendungen könnten im ersten Schritt Serienschnitte eines Tumors angefertigt werden, wobei jede zweite Schicht angefärbt und histologisch untersucht wird.

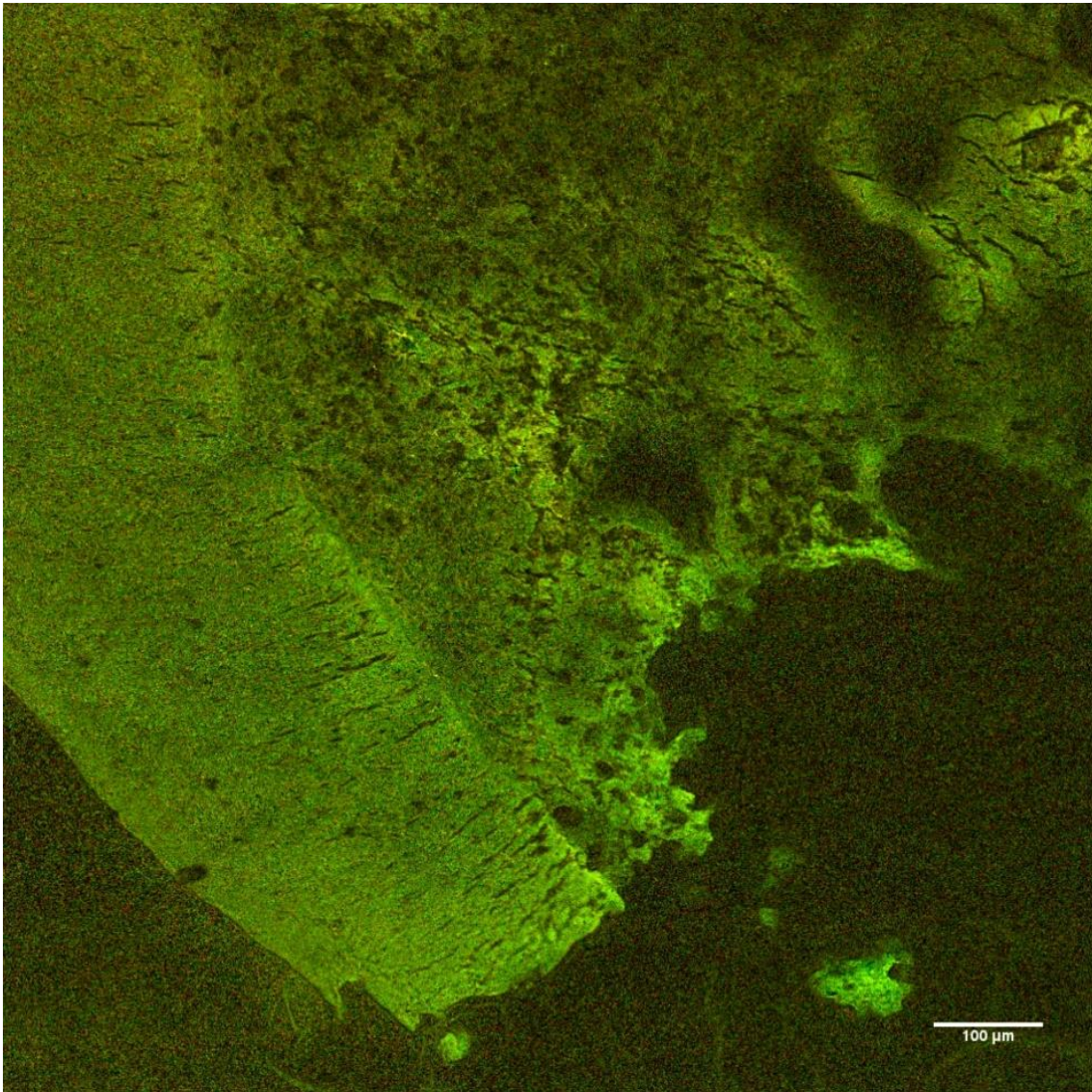


Abbildung 5-26 TICO-Raman Aufnahme eines Gefrierschnitts derselben Biopsie wie in Abbildung 5-25 und Abbildung 5-24. Die Tiefe der Schicht liegt 80 µm weiter in der Biopsie. Die Aufnahme ist 10-fach gemittelt und wurde mit 64 spektralen Punkten aufgenommen. Neben der bereits bekannten Struktur mit vielen Löchern ohne Ramansignal ist eine sich klar abgegrenzte homogene Struktur zu erkennen bei der es sich um das Epithel der Hypopharynx handeln könnte. Die zuvor diskutierten Strukturen könnten demnach muköse Drüsen oder lymphatisches Gewebe darstellen. Der grünliche Eindruck des Bildes ist auf das dominante Ramansignal der CH₃-Streckschwingung um 2930 cm⁻¹ zurückzuführen.

5.2.4.2 Fingerprint TICO-Raman Aufnahmen

Im Folgenden werden TICO-Raman Aufnahmen im Fingerprintbereich vorgestellt. Abbildung 5-27 (a) zeigt die TICO-Raman Aufnahme eines Hypopharynxkarzinoms im spektralen Fenster von 1640-1650 cm^{-1} als Intensitätsbild im „Fire“-LUT. Die TICO-Raman Daten wurden Savitzky-Golay gefiltert mit 4 Stützstellen und Polynomen zweiten Grades. Wie für die Fingerprint Aufnahmen der Nasenmuschel musste die FDML-Leistung auf 3,8 mW reduziert werden, im Vergleich zu den Aufnahmen im CH-Streckbereich, die mit $\sim 5,7$ mW aufgenommen wurden. Zudem sind die Aufnahmen 50-fach gemittelt, im Vergleich zu den Aufnahmen der Nasenmuschel, die 20-fach gemittelt sind. Als Folge steigt die Pixelaufnahmezeit auf $\sim 7,8$ ms für 64 spektrale Punkte mit $121 \mu\text{s}$ für einen einzelnen Spektralen Punkt. Die höhere Anzahl benötigter Mittelungen durch das kleinere Ramansignal, kann auf das Gewebe der Hypopharynx oder seine krankhafte Veränderung zurückzuführen sein. Gesundes Gewebe der Hypopharynx stand für eine Messung nicht zur Verfügung. Das SRG beträgt $1,5 \cdot 10^{-4}$ und ist ca. 1,5-fach so klein wie in den Fingerprint-Aufnahmen der Nasenmuschel.

Aus der eingezeichneten ROI (40 x 40 Pixel) wurde das rote TICO-Raman Spektrum in (b) gebildet. Das maximale Ramansignal ist bei 1646 cm^{-1} gegeben, was für die Amide I Bande in α -Helix Struktur spricht [70] und die Sekundärstruktur der Proteine beschreibt. Zum Vergleich ist ein spontanes Ramanspektrum eines Hypopharynxkarzinom in schwarz dargestellt. Das spontane Ramanspektrum wurde mit denselben Parametern wie für die Aufnahmen der Nasenmuschel aufgenommen (vgl Abschnitt 5.2.3). Das TICO-Raman Spektrum ist spektral breiter, was durch das Mitteln über die ROI bedingt sein kann. Betrachtet man das spektrale Fenster zwischen $1540\text{-}1580 \text{ cm}^{-1}$, können keine sich klar abgrenzenden Ramanbanden gefunden werden, die für die Aufnahme der Nasenmuschel für den zusätzlichen Ramankontrast genutzt wurden. Das TICO-Raman Spektrum zeigt im Bereich von $1740\text{-}1760 \text{ cm}^{-1}$ eine weitere Ramanbande, die der C=O Molekülbindung in Lipiden zugewiesen werden kann. Diese Ramanbande ist im spontanen Ramanspektrum nicht sichtbar. Zudem konnte in diesem spektralen Fenster kein zusätzlicher Ramankontrast aus den TICO-Raman Daten extrahiert werden. Aus der Literatur lassen sich im Fenster der Amide I Bande die C=C Molekülbindung für Lipide bei $1655\text{-}1657 \text{ cm}^{-1}$ und 1660 cm^{-1} finden [66]. Das maximale Ramansignal in Abbildung 5-27 liegt bei 1646 cm^{-1} und wird mit Proteinen assoziiert. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit eines Ramansystems mit hoher spektraler Auflösung und Abdeckung, um möglichst viele Ramanbanden für eine eindeutige Interpretation der Daten zu erhalten. In Abhängigkeit der Probe und des gewünschten Ramankontrasts, sollte eine Auflösung kleiner 10 cm^{-1} erreicht werden, was im Fall von TICO-Raman bereits in Abschnitt 5.1 für Benzonitril gezeigt wurde.

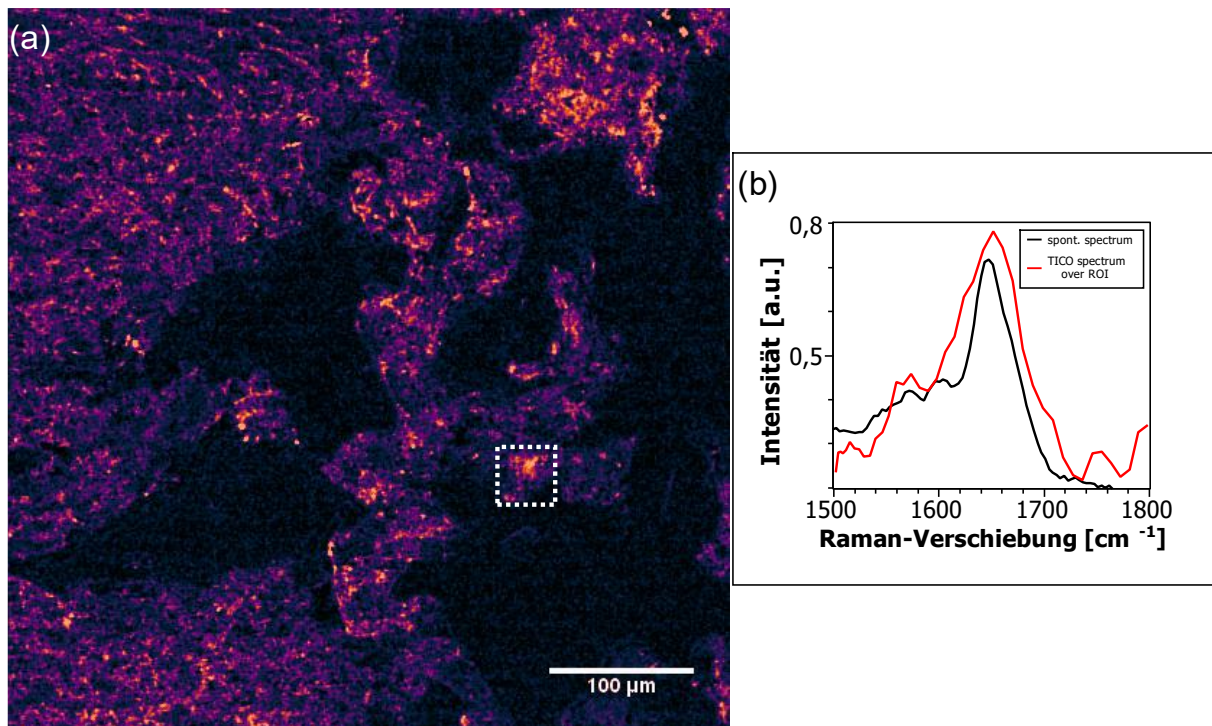


Abbildung 5-27 TICO-Raman Aufnahme eines Hypopharynxkarzinoms im Fingerprintbereich von $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ aufgenommen mit 64 spektralen Punkten (a). Die Aufnahme ist 40-fach gemittelt und zeigt die Intensität des Amide I Signals gemittelt über das spektrale Fenster von $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ im „Fire“ LUT. Über die eingezeichnete ROI (40×40 Pixel) wurde das TICO-Ramanspektrum in (b) gemittelt mit einer maximalen Ramanintensität bei 1646 cm^{-1} , was für Proteine in α -Helix Struktur spricht [70]. Zur Validierung der Daten wurden vom selben Gewebetyp ein spontanes Ramanspektrum aufgenommen, mit vergleichbarer spektraler Signatur. Das FOV beträgt $500 \times 500\text{ }\mu\text{m}$ mit 500×500 Pixeln und einer Pixelintegrationszeit von $7,8\text{ ms}$ für 64 spektrale Punkte.

5.2.4.3 Spontane Ramanspektroskopie und PCA-Analyse

Analog zur Auswertung des Nasenmuschelgewebes wird ein spontanes Raman-Spektrum der Hypopharynx, dargestellt in Abbildung 5-28, ausgewertet, wobei die Zuweisung der Molekülbindungen zu den Ramanbanden aus [66] entnommen ist, falls sie nicht abweichend gekennzeichnet sind. Im CH-Streckbereich liegen die bereits bekannten Ramanbanden vor. Allen voran die CH_3 -Streckschwingung bei 2928 cm^{-1} . Zudem ist die Ramanbande bei 3056 cm^{-1} zu nennen, die sowohl in den TICO-Spektren der Nasenmuschel als auch in den spontanen Ramanspektren zu finden ist (vgl. Abbildung 5-18). Diese Ramanbande wird nicht im Zusammenhang mit biologischen Spektren genannt. Das breite Ramansignal um 3300 cm^{-1} entspricht den O-H-Streckschwingungen [66]. Die Ramanbanden im Fingerprint-Bereich sind bereits für Abbildung 5-20 diskutiert worden. Im Allgemeinen kann durch die Ramansignale bei 2928 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} und der Amide III Bande auf ein proteinreiches Gewebe geschlossen werden.

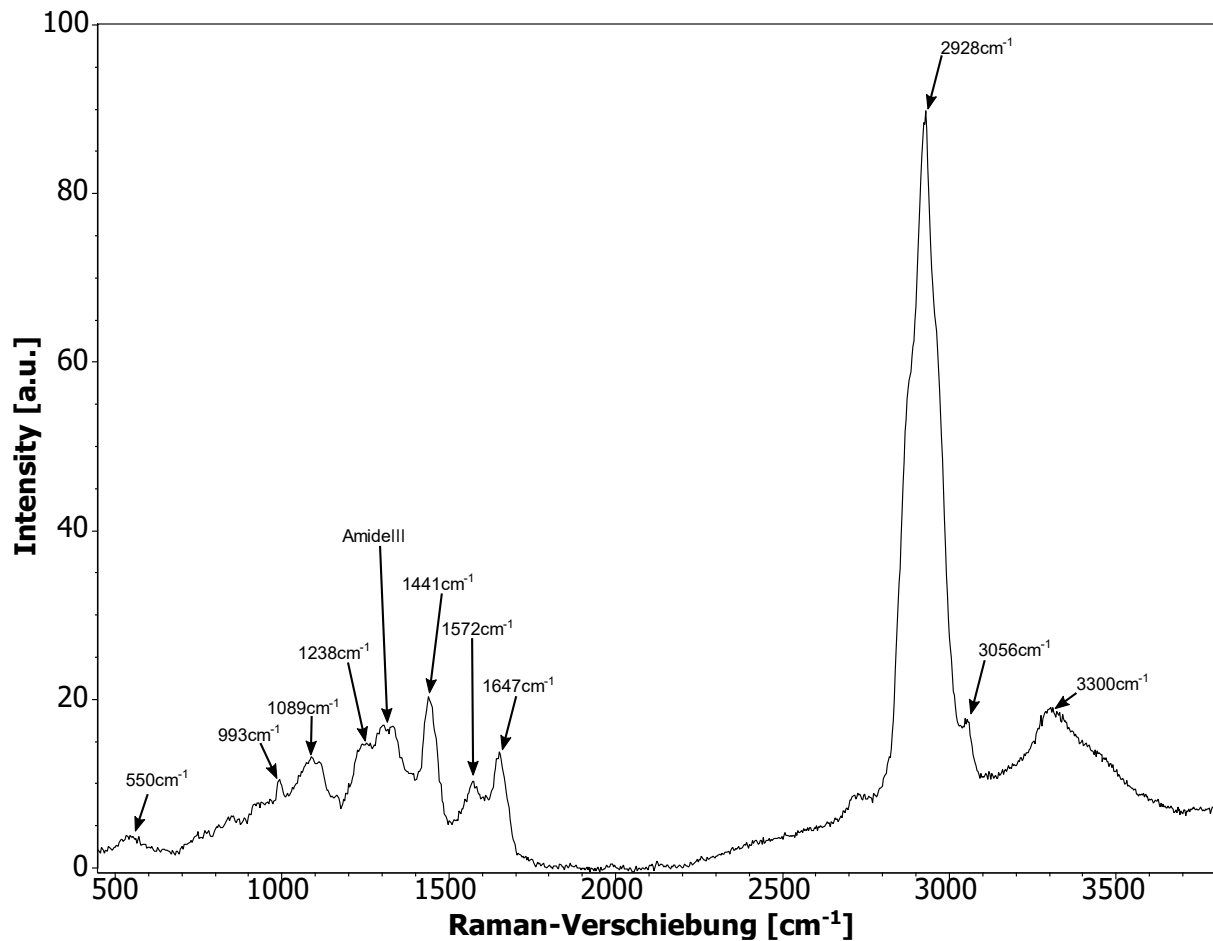


Abbildung 5-28 Spontanes Ramanspektrum eines Hypopharynxkarzinoms aufgenommen mit 532 nm, 600 l/mm und 25 s Integrationszeit. Die Ramanbanden bei 2928 cm⁻¹, 1647 cm⁻¹, Amide III und 1089 cm⁻¹ sprechen für ein Proteinspektrum. Das breite Ramansignal bei 3300 cm⁻¹ entspricht der OH Streckschwingung. Weitere Ramanbanden: 1441 cm⁻¹ CH₂, 1572 cm⁻¹ G und A, 1238 cm⁻¹ CH₂, 1089 cm⁻¹ C-C, 993 cm⁻¹ C-O und C-C, 550 cm⁻¹ Cholesterin.

Für eine bessere Beurteilung der TICO-Daten wird, analog zur Auswertung der Nasenmuschel, die PCA angewendet. Die TICO-Raman Daten wurden vor der Anwendung der PCA zweifach spektral und räumlich gemittelt. Anschließend wurden die Daten Savitzky-Golay gefiltert mit 5 Stützstellen und Polynomen dritter Ordnung. Der PCA-Algorithmus wurde für 3 Hauptkomponenten angewendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-29 dargestellt. Wie auch für das Gewebe der Nasenmuschel zeigt die erste Hauptkomponente eine spektrale sowie visuelle Übereinstimmung mit den TICO-Rohdaten. Der spektrale Verlauf der Amide I Bande ist klar identifizierbar. Zudem ist eine weitere charakteristische Ramanbande rechts der Amide I Signatur gegeben, die der bereits angesprochenen C=O Molekülbindung für Lipide bei ~1740 cm⁻¹ entsprechen könnte. Beide Merkmale sind in einer HK vorhanden, was die Ergebnisse der vorherigen Auswertung bestätigt, da kein zweiter Kontrast gefunden werden konnte. Entgegen dieser Interpretation steht die Höhe der Ramanbande bei 1740 cm⁻¹, die für das Ergebnis der PCA größer ist, im Vergleich zu den TICO-Raman Daten. Dass für das tumoröse Gewebe nur eine spektrale Komponente gefunden werden konnte, wird durch die Ergebnisse der zweiten und dritten Hauptkomponente bekräftigt: Die PCA-Ergebnisse zeigen hier keine Strukturen, die in der

Probe erkennbar sind. Zudem lässt sich von den zugehörigen Spektren nicht auf ein Ramanspektrum schließen. Die fehlende Übereinstimmung der Spektren für HK2 und HK3 mit den TICO-Rohdaten konnte auch aus den PCA-Ergebnissen der Nasenmuschel geschlossen werden (vgl. Abbildung 5-21), doch lassen sich für die Nasenmuschel visuelle Übereinstimmungen bei der Betrachtung der Bilder finden. Die Spektren von HK2 und HK3 könnten durch verbleibende, nicht balancierte Anteile des FDML-Lichts gegeben sein.

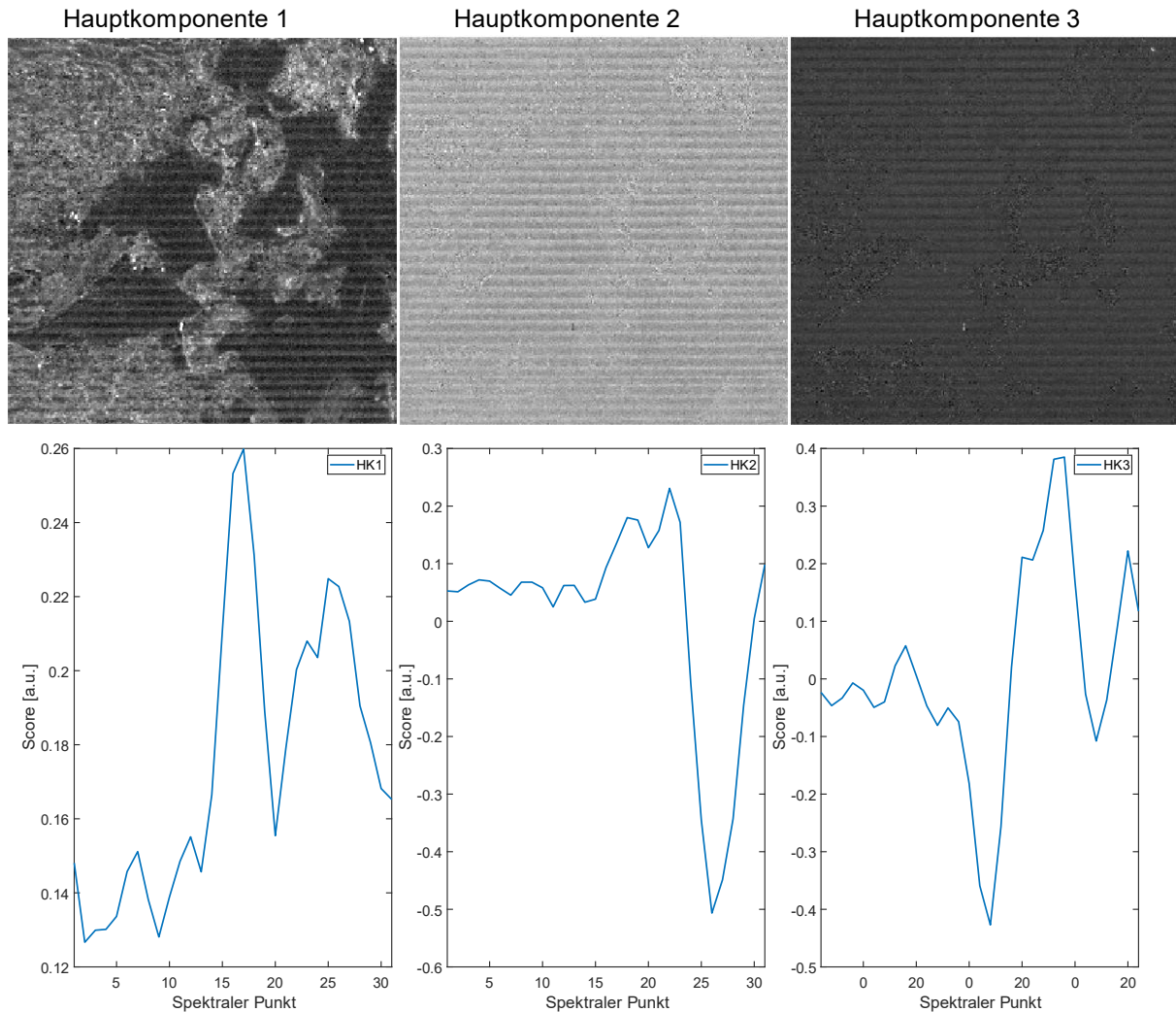


Abbildung 5-29 PCA-Ergebnisse der TICO-Raman Daten eines Hypopharynxkarzinoms mit 3 Hauptkomponenten. Die erste Hauptkomponente zeigt klare Übereinstimmungen zu den angefärbten Strukturen aus Abbildung 5-27. Das zugehörige Spektrum zeigt Gemeinsamkeiten zur Amide I Ramansignatur der Rohdaten. Die zweite sowie dritte Hauptkomponente zeigen keine direkt zugänglichen Informationen. Die gefundenen Spektren lassen nicht direkt auf ein Ramanspektrum schließen und könnten durch Restmodulationen des balancierten FDM-Lichts gegeben sein.

Für die ersten TICO-Raman Experimente im Fingerprint-Bereich wurden bereits bei der Abdeckung des spektralen Fensters von $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ Unterschiede zwischen dem gesunden und tumorösen Gewebe des Hals-Kopf-Bereichs gefunden. Die Datenbasis ist aber zu klein, um allgemeingültige Aussagen über die Ramansignatur zwischen den beiden Gewebetypen zu ziehen. Neben der Messung einer spezifischen Ramanbande ist die spektrale Signatur der Bande entscheidend, da krankhafte Veränderungen des Gewebes die Gestalt der Ramanbande ändern [127-129] [22, 23, 48, 70, 119]. Als Folge sollte die spektrale Abdeckung im Fingerprint-Bereich erweitert werden. Hierfür sind rauscharme FDML-Laser nötig, die ihren optimalen Arbeitspunkt über einen großen Wellenlängenbereich zur Verfügung stellen. FDML-Laser mit einer Zentralwellenlänge von 1300 nm und einem Abstimmbereich von 100 nm , in Kombination mit der Pumpwellenlänge 1064 nm , decken den spektralen Bereich von $1400\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ab. Biologische Proben zeigen kein Ramansignal über 1800 cm^{-1} , sodass die Pumpwellenlänge durch Ramanstreuung innerhalb des Pumplasers zu 1122 nm konvertiert werden sollte [130], um den spektralen Bereich unter 1500 cm^{-1} zu erschließen.

5.3 SRS-MIKROSKOPIE MITTELS DFB-DIODEN

Ein wesentlicher Punkt jedes Bildgebungssystems ist die Komplexität des Aufbaus. Für TICO-Raman werden zwei Laserquellen benutzt. Beide Quellen sind im Betrieb robust und eignen sich durch den kleinen Raumfaktor und die geringen Kosten für die klinische Anwendung. Die Überwachung und Bedienung des gesamten Systems ist jedoch komplex und benötigt Erfahrung sowie technisches Verständnis, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten. Die hohe Komplexität erlaubt eine Vielzahl von Messprotokollen und eine große spektrale Abdeckung, die nicht für alle Anwendungen nötig ist.

Bei bekannter Ramansignatur können die benötigten Wellenlängen zum Abtasten durch einzelne Laserdioden bereitgestellt werden. Hierdurch reduziert sich die Komplexität des Systems erheblich, da kein FDML-Laser nötig ist. Gleichzeitig kann das System kompakter und kostengünstiger aufgebaut werden.

Diese Form der SRS-Mikroskopie soll ausblickend für mögliche Ramansysteme mit minimaler Komplexität und exakt festgelegter Anwendung sein. Es wurden zwei DFB-Dioden (engl. distributed feedback laser) (Emcore: 1754C-35-BB-SC-16, 1754C-60-BB-SC-16) mit einem 50:50-Faserkoppler kombiniert und anstelle des FDML-Lasers verwendet. Die DFB-Dioden haben eine Wellenlänge von 1529,3 nm und 1549,3 nm. Die Laserdioden werden nicht moduliert und im CW-Betrieb genutzt. Für die Anregung des SRS-Prozesses stehen ~5 mW zur Verfügung. Die verwendete Pulsleistung entspricht den zuvor verwendeten 1,6 kW bei 1064 nm. Dargestellt in Abbildung 5-30 sind zwei Aufnahmen humaner Haut. Beide Aufnahmen sind 40-fach gemittelt. Die Pixelintegrationszeit beider Aufnahmen beträgt ~190 μ s. Auf der linken Seite sind Lipidtröpfchen in der Subkutis dargestellt, die der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung bei ~2860 cm^{-1} entsprechen [66, 76]. Rechts ist das Ramansignal der Wellenzahl ~2940 cm^{-1} dargestellt. Die Struktur könnte das Stratum Corneum der Haut darstellen. Die Laserleistungen sind vergleichbar mit den TICO-Raman Messungen mit einem FDML-Laser, was sich in den erreichten Signalhöhen zeigt. Für TICO-Raman wurde ein SRG von $7,94 * 10^{-4}$ mit einem SNR von 8,2 gemessen, wobei mit den DFB-Dioden ein SRG von $8,89 * 10^{-4}$ und ein SNR von 7,55 erreicht werden konnte.

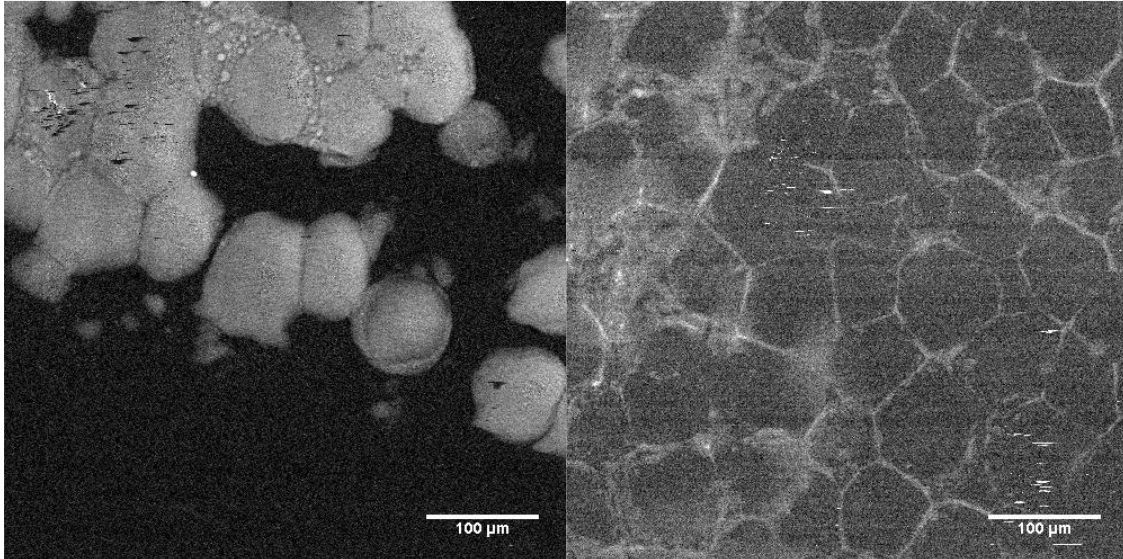


Abbildung 5-30 SRS-Mikroskopie mit DFB-Dioden als Abtastlaser. Die DFB-Diode mit einer Wellenlänge von ~ 1529 nm ergibt in Kombination mit 1064 nm als Pumplichtwellenlänge die Wellenzahl 2860 cm^{-1} (CH_2 -Streckschwingung in Lipiden), die für die linke Aufnahme genutzt wurde. Es können Lipidtröpfchen in der Haut dargestellt werden. Die antisymmetrische Streckschwingung der CH_2 -Molekülbindung (2942 cm^{-1}) wird im rechten Bild im Stratum Corneum angeregt. Kombiniert hierfür werden die Wellenlängen ~ 1549 nm und 1064 nm. Die Pixelintegrationszeit beträgt in beiden Aufnahmen 190 μs .

Obwohl das SRG vergleichbar ist, weicht das SNR von den erwarteten Werten ab. Die TICO-Raman Aufnahmen der humanen Haut sind 20-fach gemittelt, im Vergleich zu den 40-fach gemittelten Aufnahmen unter Verwendung der DFB-Dioden. Zudem führt der CW-Betrieb der Dioden zu einer vereinfachten Balancierung des Lichts, da keine Modulationen, Interferenzen an optischen Komponenten oder Amplitudenrauschen durch mangelnde Dispersionskontrolle im FDML-Laser das Signal stören.

Die bereits geschilderten Vorteile von einzelnen Wellenlängen für die Anregung sind auch der größte Nachteil des Systems. Leichte Abweichungen der Lage der Ramanbande gegenüber den erwarteten Werten führt zu einer Abnahme des Ramansignals. Eine falsche Interpretation der Daten ist hierdurch wahrscheinlich. Besonders für biologische Proben kann die Lage der Ramanbande variieren, sodass die Wahl der Anwendung entscheidend ist. Mögliche Anwendungen im CH-Streckbereich wie der Lipid-Protein-Kontrast sind vielversprechend für die Anwendung mit einzelnen Dioden. Weitere Anwendungen im Fingerprint-Bereich könnten mit 5-20 unterschiedlichen Dioden realisiert werden. Bei der Abdeckung mehrerer Ramanbanden ist die zur Verfügung stehende Datenbasis größer, sodass selbst nicht vorhergesehene Abweichungen der Bandenlage von anderen spektralen Punkten kompensiert werden können, was die Interpretation robuster macht.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Folgenden werden die Ergebnisse zusammengefasst und ein Ausblick für zukünftige Anwendungen und Forschungsschwerpunkte der stimulierten Ramanmikroskopie gegeben. Das TICO-Raman Konzept wurde im Rahmen dieser Arbeit in den biomedizinisch optischen Bereich überführt. Unterschiedliche Gewebeprouben wurden erfolgreich mikroskopiert und ausgewertet. Die TICO-Raman Spektren konnten durch Spektren des spontanen Ramanmikroskops validiert werden. Das Aufnahmekonzept „Sparse Sampling“ für die gezielte Aufnahme der charakteristischen spektralen Punkte wurde an Ramanphantomen (PS- und PMMA-Kugeln) sowie biologischen Proben validiert.

Für PS- und PMMA-Kugeln konnte bei einer Pixelintegrationszeit von 35 μs (6 spektrale Punkte, 2-fach gemittelt, 2,5 μs FDML-Periode) eine Linienrate von 88 Hz umgesetzt werden, die für den vollen Verfahrensweg 10-fach über der maximalen Scanfrequenz der Voice-Coil-Stage liegt. Die Unterscheidung zweier Spezies anhand weniger charakteristischer spektraler Punkte wird durch diese Messung bestätigt.

Die Übereinstimmung zwischen den TICO-Raman Spektren und den spontanen Ramanspektren, wurde anhand der 4 cm^{-1} schmalen Ramanbande von Benzonitril im Fingerprintbereich bei 1600 cm^{-1} gezeigt.

Die biomedizinische Anwendung wurde für Gefrierschnitte humaner Kopfhaut erstmalig demonstriert. Im CH-Streckbereich von 2800-3100 cm^{-1} wurden TICO-Raman Aufnahmen mit 64 spektralen Punkten aufgenommen. Die dominierende spektrale Signatur ist durch Lipide gegeben, die mit hoher Konzentration besonders in der Subkutis vorhanden sind. Die wesentlichen Ramanbanden liegen bei 2850 cm^{-1} für die CH_2 -Streckschwingung, 2880 cm^{-1} für die Fermiresonanz der CH_2 -Molekülbindung sowie 2930 cm^{-1} für die CH_3 -Streckschwingung. Zusätzlich liegt bei $\sim 3005\text{-}3015 \text{ cm}^{-1}$ die $=\text{CH}$ -Schwingung der Fettsäuren. Lipid- und proteinhaltiges Gewebe lässt sich anhand der Ramansignale bei 2850 cm^{-1} und 2930 cm^{-1} trennen. Dieser Kontrast wurde unter Verwendung von Sparse Sampling mit TICO-Raman aufgenommen. Es wurden jeweils drei spektrale Punkte um die CH_2 -Streckschwingung bei 2850 cm^{-1} und der CH_3 -Streckschwingung bei 2930 cm^{-1} verteilt. Lipidtropfen grenzen sich klar von den umliegenden Gewebeanteilen ab. Das Ramansignal von $\sim 13 \text{ mV}$ bei 1,6 kW Spitzenpulsleistung und 4,5 mW FDML-Leistung erlaubt eine Aufnahme mit 20-fach gemittelten Daten, was zu einer Aufnahmezeit von 350 μs führt. Das SRG beträgt $7,94 * 10^{-4}$ mit einem SNR von 8,2. Kürzere Aufnahmezeiten konnten mit 2 spektralen Punkten und 30-fach gemittelten Daten (225 μs Pixelintegrationszeit) umgesetzt werden. Das Verfahren der Probe und die geringen Aufnahmezeiten erlauben es, große Bildfelder (2 mm^2) in wenigen Minuten aufzunehmen.

Die spontanen Ramanspektren zeigen für die Epidermis, Dermis sowie Subkutis unterschiedliche Ramansignaturen im CH-Streckbereich, wobei die charakteristischen Banden bereits genannt wurden. Die Ramanbanden im Fingerprintbereich unterstützen im Wesentlichen die Ramanbanden des CH-

Streckbereichs: 1740 cm^{-1} für die C=O-Molekülbindung des Esters in Fettsäuren in Lipiden wie die Ramanbande bei 1450 cm^{-1} , die der Scherschwingung der CH_2 -Molekülbindung entspricht. In der humanen Haut gibt es eine Doppelzuweisung für zwei Ramanbanden, die den Proteinen sowie Lipiden zugewiesen werden können. Hierbei handelt es sich um die Ramanbanden bei 1650 cm^{-1} und 1270 cm^{-1} für die C=C-Molekülbindung in Lipiden. Dieselben Ramanbanden können der Amide I und Amide III Bande zugewiesen werden. Zusätzlich ist in der Dermis und Epidermis eine Ramanbande bei $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ zu sehen, die Phenylalanin oder NADH zugewiesen werden kann.

Die zweite Gewebeklasse wird durch Gefrierschnitte des Gehirns eines Hausschweins gebildet. Die TICO-Raman Spektren im CH-Streckbereich sind vergleichbar mit den Ramansignaturen der humanen Haut. Das fettige Hirngewebe führt zu einem Ramansignal bei 2850 cm^{-1} , welches besonders in der weißen Substanz durch den hohen Myelingegehalt bedingt ist.

Die TICO-Ramanaufnahmen mit 64 spektralen Punkten zeigen klar die charakteristischen Ramansignaturen von Hirngewebe, die für die Separation der Zellkerne vom restlichen Gewebe nötig sind. Die Qualität der Aufnahmen liegt jedoch hinter den Ergebnissen etablierter Ramansysteme, die für die Messung von Hirngewebe optimiert sind. Im Allgemeinen ist die Signalstärke geringer ($5\text{--}7\text{ mV}$), im Vergleich zur humanen Haut (20 mV), trotz des hohen Lipidgehalts. Es wurden dieselben Laserparameter genutzt ($1,6\text{ kW}$ Spitzenleistung des Pumplasers und $4,5\text{ mW}$ FDML Leistung). Aufgrund des kleineren Signals mussten die Aufnahmen 40-fach gemittelt werden. Das SNR beträgt 5,5 mit einem SRG von $7,3 \cdot 10^{-4}$ und $3,49 \cdot 10^{-4}$ in Abhängigkeit des mikroskopierten Gefrierschnitts. Die Pixelintegrationszeit beträgt $6,24\text{ ms}$, wobei für einen einzelnen spektralen Punkt $96\text{ }\mu\text{s}$ benötigt werden. Dies liegt über den aktuell schnellsten Anwendungen für Hirngewebe mit Integrationszeiten von $\sim 1\text{ }\mu\text{s}$. Die längeren Aufnahmezeiten sind für TICO-Raman im Wesentlichen durch die geringe Leistung des Abtastlasers von wenigen mW bedingt. Eine Erhöhung der Pumplaserleistung ist mit dem aktuellen Abtastverhältnis nicht ratsam, da die Durchschnittsleistung auf der Probe erhöht wird und die Probe zerstört werden kann. Eine kleinere Repetitionsrate mit höherer Spitzenleistung der Pulse würde zu einer vergleichbaren Dauerstrichleistung führen, wobei die Aufnahme durch die niedrige Repetitionsrate verlängert wird.

Das spontane Ramanspektrum des Hirngewebes weist eine Vielzahl von Ramanbanden auf. Im CH-Streckbereich decken sich die Ramanbanden mit den bereits genannten Banden, die auch in der humanen Haut aufgetreten sind. Im Fingerprint-Bereich ist zusätzlich die Ramanbande bei 1575 cm^{-1} für Guanin und Adenin vorhanden. Die Amide III Bande liegt hier bei 1290 cm^{-1} . Eine weitere neue Bande liegt bei 1117 cm^{-1} und kann der Glucose zugewiesen werden. Für 1076 cm^{-1} ist die C-C-Streckschwingung verantwortlich. Eine der DNS zugeordnete Bande liegt bei 740 cm^{-1} .

Die Vielzahl von neuen Ramanbanden im Fingerprintbereich könnten einen zusätzlichen chemischen Kontrast liefern. Gleichzeitig können bereits bekannte Kontrastmechanismen, wie der Amyloid-Gehalt

in β -Faltblattstruktur, anhand der Verschiebung der Amide I Bande gemessen werden. Diese Änderung zeigt sich in degeneriertem Hirngewebe als Vorstufe und Begleiterscheinung einer Alzheimererkrankung. Aufgrund der geringen Signalstärke im CH-Streckbereich wurde vorerst auf eine Messung im Fingerprintbereich verzichtet. Zukünftig sollte vorerst eine Optimierung des Signals im CH-Streckbereich erfolgen, bevor die kleineren Signale des Fingerprintbereichs gemessen werden.

Eine andere Gewebeklasse wird durch die Biopsien des Hals- und Nasenbereichs gebildet. Zuerst werden die Ergebnisse für das gesunde Nasenmuschelgewebe zusammengefasst.

Auch für das Gewebe der Nasenmuschel konnte erfolgreich Sparse Sampling angewendet werden, sodass von den initialen 3,2 ms Pixelintegrationszeit für 64 spektrale Punkte, die Integrationszeit auf 432 μ s reduziert wurde. Das SRG für das Nasenmuschelgewebe beträgt $3,45 * 10^{-4}$ bzw. $5,39 * 10^{-4}$ in Abhängigkeit des mikroskopierten Gefrierschnitts. Die Laserparameter betragen 1,6 kW Spitzenleistung der Pumppulse und 5,3 mW FDML-Leistung. Die Aussagekraft der Ramandaten ist begrenzt: Es kann zwar zwischen Lipid- und proteinhaltigem Gewebe unterschieden werden, aber eine konkrete Anwendung konnte nicht abgeleitet werden. Für das Gewebe der Nasenmuschel liegen wenig Vergleichsdaten vor. Zur Erhöhung der Aussagekraft wurde ein PCA-Algorithmus auf einem anderen Datensatz angewendet und mit der konventionellen Auswertung der Daten verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der PCA den Kontrast im Gewebe verbessern. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist die Übereinstimmung der TICO-Ramanspektren mit den Spektren des spontanen Ramanmikroskops.

Neben den Aufnahmen im CH-Streckbereich wurden erstmalig TICO-Raman Aufnahmen im Fingerprint-Bereich von klinisch relevantem Gewebe durchgeführt. Die Aufnahmen im spektralen Fenster von 1500-1800 cm^{-1} zeigen eindeutig die Amide I Bande bei 1647 cm^{-1} in α -Helix Struktur. Eine weitere Ramansignatur konnte im spektralen Fenster von 1540-1580 cm^{-1} gemessen werden. Hier kann die Aminosäure Tyrosin und die Nukleinbasen Adenin und Guanin zugewiesen werden. Dieselben Spektren wurden mit dem spontanen Ramanmikroskop gemessen. Die Aufnahmen sind 20-fach gemittelt mit einer Leistung von 3,8 mW des 1300 nm FDML-Lasers und 1,3 kW Spitzenleistung der Pumppulse. Die Leistung musste somit im Vergleich zum CH-Streckbereich um ~ 1 mW verringert werden, um eine Messung am Schrotrauschlimit zu gewährleisten. Die Integrationszeit für jeden spektralen Punkt beträgt 48 μ s. Andere SRS-Systeme, die im Fingerprint-Bereich messen, erreichen Integrationszeiten von ~ 10 μ s, sodass das TICO-Raman System ca. 5-10-fach langsamer als die weltweit schnellsten Systeme ist. Der SRG-Anteil beträgt im Fingerprintbereich im Maximum $2,5 * 10^{-4}$. Das Nasenmuschelgewebe erwies sich sowohl im CH-Streckbereich als auch im Fingerprintbereich als geeignete Probe mit einer Vielzahl unterschiedlicher Ramanbanden.

Die spektrale Signatur im CH-Streckbereich deckt sich mit den zuvor zusammengefassten Gewebetypen. Im Fingerprint-Bereich kommt, abgrenzend zu den anderen Gewebetypen, die Ramanbande bei 1124 cm^{-1} hinzu, die der C-C und C-N Molekülbindung zugeordnet wird und nur für Gewebebestandteile des grünen Kanals mit seiner charakteristischen Doppel-Bande zwischen $1540\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ gemessen wurde. Im spektralen Bereich zwischen $1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ ist eine Vielzahl von Ramanbanden zu nennen, die mit Proteinen und Collagen assoziiert werden.

Die bereits im CH-Streckbereich angewendete PCA wurde auf die TICO-Raman Daten des Fingerprintbereichs angewendet. Das beste Ergebnis wurde für 3 Hauptkomponenten erreicht. Die Spektren der ersten Hauptkomponente zeigen eindeutig die Amide I Bande. Für die zweite Hauptkomponente werden mit dem grünen Kanal ($1540\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) vergleichbare Anteile der Probe eingefärbt. Das Spektrum der Hauptkomponente zeigt aber keine Ähnlichkeiten zum TICO-Ramanspektrum. Dies gilt auch für die dritte Hauptkomponente.

Das tumoröse Gewebe der Hypopharynx zeigt im CH-Streckbereich dieselben charakteristischen Ramanbanden wie die übrigen Gewebetypen. Integrationszeiten von $24\text{ }\mu\text{s}$ für einen spektralen Punkt konnten erreicht werden. Die applizierte Leistung betrug $5,7\text{ mW}$ für den FDML-Laser und $1,6\text{ kW}$ für die Pumpulse. Das SRG beträgt $6,46 \cdot 10^{-4}$. Das Gewebe der Hypopharynx erlaubt eine Kontrastierung unter Nutzung einzelner spektraler Punkte sowie die Kontrastierung des Lipid- und Proteinanteils durch Differenzbildung, wie in den übrigen Gewebetypen.

Sparse Sampling konnte erfolgreich umgesetzt werden, ohne den Verlust der Bildqualität. Darauf aufbauend wurden größere Bildfelder aufgenommen, die zwei sich klar abgrenzende Morphologien des Gewebes zeigen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um das Epithel und die darunter liegenden mukösen Drüsen sowie lymphatisches Gewebe. Im Vergleich zu anderen Proben fällt die Dominanz des Proteinsignals bei 2930 cm^{-1} auf.

Die Aufnahmen im Fingerprintbereich zeigen eine verringerte spektrale Informationsdichte im spektralen Fenster von $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Zudem muss die Anzahl gemittelter Aufnahmen auf 50 erhöht werden, was die Pixelintegrationszeit für 64 spektrale Punkte auf $7,2\text{ ms}$ erhöht. Die Laserparameter sind identisch zu den Fingerprintaufnahmen der Nasenmuschel. Die Spektren zeigen lediglich das Ramansignal der Amide I Bande bei 1647 cm^{-1} . Es lässt sich keine zusätzlich abgrenzende Ramansignatur zwischen $1540\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ extrahieren. Diese Ergebnisse werden auch hier durch die spontanen Ramanspektren bestätigt. Das SRG beträgt im Fingerprintbereich lediglich $1,5 \cdot 10^{-4}$.

Die Daten werden weiter durch die Ergebnisse der PCA bekräftigt. Die erste Hauptkomponente zeigt klare Übereinstimmungen mit der Amide I Bande. Die weiteren Hauptkomponenten zeigen kein eindeutiges Ramanspektrum und könnten durch Restmodulationen FDML-Lichts nach der Balancierung gegeben sein.

Die spontanen Spektren zeigen im Fingerprint-Bereich eine Vielzahl von Ramanbanden. Im Wesentlichen sind die Ramanbanden Proteinen, Aminosäuren und Nukleinsäuren zugeordnet: Amide I bei 1647 cm^{-1} , A und G bei 1572 cm^{-1} , CH_2 bei 1441 cm^{-1} , Amide III bei 1300 cm^{-1} , CH_2 bei 1238 cm^{-1} , C-C 1089 cm^{-1} , C-O und C-C bei 993 cm^{-1} , Cholesterol bei 550 cm^{-1} .

Zukünftige Arbeiten zu TICO-Raman sollten sich auf einen tiefergehenden Vergleich zwischen gesundem und krankhaftem Gewebe desselben Typs fokussieren, wobei andere Bildgebungsmodalitäten und Färbeprotokolle mit einbezogen werden sollten. Außerdem sollten die TICO-Raman Ergebnisse mit etablierten Färbeverfahren verglichen werden. Auf dieser Basis könnten in Zukunft allgemeingültige Merkmale aus den Ramanspektren gewonnen werden, um eine Anwendung abzuleiten.

Das TICO-Raman Konzept hat sich als vielversprechende Methode für eine Vielzahl von SRS-Anwendungen gezeigt. Das System ist in der Lage, klinische relevante Proben im CH-Streckbereich und Fingerprint-Bereich zu messen. Die gezeigten Spektren decken sich mit spontanen Ramanspektren desselben Gewebes. Bereits ohne nennenswerte Vorverarbeitung lassen sich die Rohdaten für einen Ramankontrast nutzen. Multivariate Analysemethoden wie die PCA bestätigen die TICO-Raman Ergebnisse und zeigen durch die neue Datenbasis eine bessere Separation der spektralen Informationen. Die Integrationszeit für Spektren mit 64 spektralen Punkten liegt im Millisekundenbereich ($\sim 5\text{ ms}$). Die weltweit schnellsten Systeme erreichen Aufnahmegeschwindigkeiten, die $\sim 10\text{-}20$ -fach schneller sind als das TICO-Raman System. Dieser Nachteil ist im Wesentlichen durch die geringe Leistung des FDML-Lasers gegeben. Für den 1550 nm FDML-Laser ist eine Verstärkung in Erbium dotierten Glasfasern denkbar.

Neben der geringen Leistung des FDML-Lasers wird die Balancierung, durch die sich ändernde Wellenlänge des FDML-Lasers erschwert. Schwebungssignale an den optischen Komponenten des Strahlengangs werden durch die AC-gekoppelte Photodiode detektiert. Hinzu kommt das Laserrauschen des FDML-Lasers. Eine stabile rauscharme CW-Lichtquelle würde zu weniger Modulationen und Störungen des Rohsignals führen. Da das Raman-Signal nur mit dem Pumpuls als ein sich zeitlich änderndes Signal auftritt, könnte im Idealfall auf eine Balancierung bei der Verwendung einer AC gekoppelten Photodiode verzichtet werden. Zusätzlich würde die Einstellung der Phase für die Anpassung aus FDML-Start und dem ersten Pumpuls, für die korrekte Wellenzahlzuweisung, entfallen. Theoretisch erlaubt die Abstimmrate des FDML-Lasers das Ändern der abgetasteten Raman-Information zwischen einzelnen Pixeln einer Zeile, um das Sparse Sampling Konzept von der spektralen Domäne auf die örtliche Domäne zu erweitern. Wahrscheinlich ist jedoch eine Änderung der abgetasteten Raman-Information zwischen einzelnen Zeilen oder Bildern ausreichend, sodass Lasersysteme außerhalb des FDML-Konzepts für TICO-Raman besser geeignet sein könnten. Zukünftige Arbeiten werden den Einsatz anderer Lasersysteme für TICO-Raman evaluieren.

Die Komplexität des TICO-Raman Systems würde hierdurch deutlich reduziert werden. Schnelle SRS-Anwendungen, die für die Aufnahme einzelner spektrale Punkte optimiert ist, könnten zu schnellen Aufnahmegeschwindigkeiten und kompakten Systemen führen. Dies wurde durch die Ramanbildgebung unter Verwendung von DFB-Dioden als Abtastlaser motiviert mit vergleichbaren SRG für die mikroskopierte humane Haut ($SRG_{FDML} = 7,94 * 10^{-4}$ $SRG_{DFB} = 8,889 * 10^{-4}$). Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung von DFB-Dioden ist die Inflexibilität gegenüber leichten Änderungen der Position der Ramanbanden. Unterschiedliche Gewebetypen oder Umgebungsbedingungen derselben Probe können zu einer Verschiebung der Ramanbande führen.

Eine weitere Möglichkeit, die Aufnahmegeschwindigkeit zu erhöhen ist, eine höhere Repetitionsrate der Laser umzusetzen. FDML-Laser erlauben Repetitionsraten von bis zu 12 MHz, im Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ~ 400 kHz. Der Pumplaser kann Pulse mit 30 ps und höheren Repetitionsraten erzeugen, sodass höhere Spitzenleistungen der Pulse umgesetzt werden können, ohne die Durchschnittsleistung auf der Probe zu erhöhen. Dies bedingt jedoch eine Anpassung der Detektionseinheit, da für eine zeitliche Auflösung der kürzeren Pulse höhere Analogbandbreiten des balancierten Detektors benötigt werden.

Das Haupteinsatzgebiet von FDML-Lasern sind schnelle OCT-Anwendungen. Hier können große Bildfelder in kurzer Zeit aufgenommen werden. Die punktweise und gezielte Aufnahme hochqualitativer TICO-Raman Spektren könnte mit den OCT-Daten überlagert werden, um für einige Punkte eine chemische Beurteilung der Probe zu erzeugen. Im Anschluss an die Aufnahme können semi- oder vollautomatische Auswertungsverfahren die Spektren klassifizieren und eine, auf der Basis der Morphologie der Probe unterstützende, medizinische Beurteilung des Gewebes erlauben. Durch die geringe Anzahl aufgenommener Punkte spielt die Integrationszeit eine untergeordnete Rolle. Besonders in zeit- und entscheidungskritischen Situationen können zusätzliche Informationen die Entscheidung des Arztes positiv beeinflussen.

Die zukünftigen Forschungsbemühungen für TICO-Raman sollten daher neben dem klassischen Ansatz mittels FDML-Laser, auf eine Reduzierung der Komplexität des Aufbaus durch neue Lichtquellen setzen. Außerdem spielt die Auswertung der TICO-Raman Daten eine wesentliche Rolle, um die Informationsdichte der Spektren effektiv und umfassend zu nutzen.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3-1: Energieschema der spontanen Ramanstreuung..	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 3-2 Energieschema der stimulierten Ramanstreuung: ...	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 3-3 Spontanes Ramanspektrum eines humanen Hypopharynxkarzinoms.	17
Abbildung 3-4 Spontanes Ramanspektrum eines humanen Hypopharynxkarzinoms im Fingerprint-Bereich von $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$..	20
Abbildung 3-5 Prinzip für die Erzeugung des Ramansignals aus Pumplaser und FDML Laser.	24
Abbildung 3-6 TICO Raman Konzept	25
Abbildung 4-1 Verwendetes Ramanmikrospektrometer Horiba XPlora Plus.	26
Abbildung 4-2 Schemazeichnung des optischen Strahlengangs des Horiba XPlora Plus.	27
Abbildung 4-3 Quanteneffizienz (QE) gegenüber der Wellenlänge für unterschiedliche CCD-Kameras.	29
Abbildung 4-4 Schematischer Aufbau des Masterszillators des Pumplasers.	31
Abbildung 4-5 Unterdrückung des EOMs gemessen mit einem optischen Spektrum Analysator (OSA) und zeitlich aufgelöster Startpuls nach dem EOM.	32
Abbildung 4-6 Zeichnung des Pumplasers.	33
Abbildung 4-7 Spektrum für das Signallicht bei 1064 nm für die erste Ytterbium-Stufe aufgenommen.	35
Abbildung 4-8 Linear aufgetragenes Spektrum des Pumplasers nach der ersten Verstärkerstufe vor dem Laserlinienfilter (LLF).	36
Abbildung 4-9 OSA-Spektrum für das Signallicht bei 1064 nm für die zweite Ytterbium-Stufe.	37
Abbildung 4-10 OSA-Spektrum für das Signallicht bei 1064 nm der Doppelmantel-Ytterbium-Stufe.	39
Abbildung 4-11 Zeitaufgelöster Laserpuls am Faserausgang und Spitzenleistung der Laserpulse gegenüber dem Pumpstrom im Doppelmantelverstärker.	40
Abbildung 4-12 Vereinfachte Darstellung eines FDML-Lasers.	42
Abbildung 4-13 Zeitaufgelöster Sweep des verwendeten 1300 nm FDML-Lasers.	44
Abbildung 4-14 Laserspektrum des 1300 nm FDML-Lasers.	45
Abbildung 4-15 Laserspektrum des 1550 nm FDML-Lasers.	46
Abbildung 4-16 Zeitaufgelöste Aufnahme des 1550 nm FDML-Lasers für zwei unterschiedliche Filterfrequenzen.	47
Abbildung 4-17 Schematischer Aufbau des optischen Strahlengangs des Probenarms.	49
Abbildung 4-18 Bildartefakte beim Verwenden der Voice-Coil-Stage.	52
Abbildung 4-19 Verwendete Wellenformen für die Synchronisierung aus Digitalisierung und der Voice-Coil-Stage (VCS).	53

Abbildung 4-20 Schema des elektronischen Setups für die Synchronisation zwischen den Laserquellen und der Datenerfassung.....	57
Abbildung 4-21 Wellenformen die im AWG für die Synchronisierung hinterlegt sind.	58
Abbildung 4-22 Rohdaten der ADC-Karte für das balancierte FDML-Licht.....	59
Abbildung 4-23 TICO-Konzept im Fall von Sparse-Sampling.....	60
Abbildung 5-1 Ramanspektrum von PMMA aufgenommen im spektralen Fenster von 2750-3060 cm^{-1} mit 64 spektralen Punkten.	63
Abbildung 5-2 TICO-Raman Spektrum (rot) und ein spontanes Ramanspektrum (schwarz) von Benzonitril im spektralen Fenster von 1590-1610 cm^{-1}	64
Abbildung 5-3 Ramanspektrum von PMMA (rot) und PS (blau) aufgenommen im spektralen Fenster von 2820-3120 cm^{-1} mit 64 spektralen Punkten.	65
Abbildung 5-4 TICO-Raman Aufnahme von PMMA- (rot) und PS-Kugeln (blau) mit 64 spektralen Punkten inklusive Linienprofil.	66
Abbildung 5-5 Ramanspektrum von PMMA (rot) und PS (blau) im spektralen Fenster von 2800-3120 cm^{-1} aufgenommen mit 64 spektralen Punkten. Die 6 Pfeile zeigen die spektralen Punkte der Sparse Sampling Konfiguration für die spektrale Trennung von PMMA und PS.	67
Abbildung 5-6 TICO-Raman Aufnahme von PMMA-(rot) und PS-Kugeln desselben FOV wie in Abbildung 5-4 (512x512 μm , 256x256 Pixel) aufgenommen mit 6 spektralen Punkten und gleichen Laserparametern.	68
Abbildung 5-7 TICO-Raman Aufnahme von PMMA-(rot) und PS-Kugeln (blau) mit 6 spektralen Punkten. Die Daten sind zweifach gemittelt, was zu einer Pixelaufnahmezeit von 33,5 μs führt.....	69
Abbildung 5-8 TICO-Ramanspektrum mit 64 spektralen Punkten im Wellenzahlbereich von 2820-3150 cm^{-1} zeigt die Raman aktiven Moden der Methyl- (CH_2) und Methylengruppe (CH_3) von 2850-2930 cm^{-1} . Für das Spektrum wurde eine Lipidansammlung in humaner Haut aufgenommen und 20-fach gemittelt.	71
Abbildung 5-9 TICO-Raman Aufnahme von humaner Haut mit 6 spektralen Punkten. Jeweils 3 spektrale Punkte für die CH_2 - und CH_3 - Molekülbindung zum Trennen der lipid- und proteinreichen Gewebeanteile.	73
Abbildung 5-10 TICO-Raman Aufnahme von humaner Haut aufgenommen mit 2 spektralen Punkten und 30-fach gemittelten Daten im RGB-Farbmodell.....	75
Abbildung 5-11 Spontane Ramanspektren humaner Haut für die Epidermis, Dermis und Subkutis.. ..	77
Abbildung 5-12 TICO-Raman Aufnahme eines Schweinehirn-Gefrierschnitts mit drei spektralen Kanälen.	81
Abbildung 5-13 TICO-Raman Aufnahme von Schweinehirn mit zwei spektralen Kanälen.....	83
Abbildung 5-14 Spontanes Ramanspektrum eines Schweinehirn-Gefrierschnitts.	85

Abbildung 5-15 TICO-Aufnahme eines Nasenmuschel-Gefrierschnitts. Dasselbe FOV mit einer Größe von 500 x 500 μm (500 x 500 Pixel) wurde mit 64 spektralen Punkten (SP) und mit 8 spektralen Punkten in Sparse-Sampling Konfiguration aufgenommen.....	88
Abbildung 5-16 Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (engl. PCA) mit 3 drei Hauptkomponenten links, im Vergleich zu einer Durchlichtaufnahme desselben FOVs eines Nasenmuschelgefrierschnitts.	90
Abbildung 5-17 Gleicher TICO-Raman Datensatz aus Abbildung 5-16 ausgewertet ohne PCA..	91
Abbildung 5-18 TICO-Raman Aufnahme eines Nasenmuschelgefrierschnitts. Grün stellt proteinreiches Gewebe bei 2935 cm^{-1} dar und rote Strukturen lipidreiches Gewebe um 2870 cm^{-1}	93
Abbildung 5-19 TICO-Raman Aufnahme im Fingerprintbereich von einem Nasenmuschelgefrierschnitt.	97
Abbildung 5-20 Charakteristische spontane Ramanspektren des Nasenmuschel-Gewebes.....	98
Abbildung 5-21 PCA-Analyse der Fingerprint TICO-Raman Daten aus Abbildung 5-19 mit drei Hauptkomponenten (HK).....	100
Abbildung 5-22 TICO-Raman Aufnahme mit 64 spektralen Punkten eines Hypopharynxkarzinoms im CH-Streckbereich von 2757-3056 cm^{-1}	103
Abbildung 5-23 Ramankontrast durch Differenzbildung des Lipid- (hier 2870 cm^{-1}) und Proteinkanals ($\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$) eines Hypopharynxkarzinoms.	104
Abbildung 5-24 Vergleich zweier TICO-Raman Aufnahmen aufgenommen mit 64 und 6 spektralen Punkten in Sparse Sampling Konfiguration..	105
Abbildung 5-25 Sparse Sampling TICO-Raman Aufnahme mit 6 spektralen Punkten für ein 1000 x 1000 μm großes FOV mit 1000 x 1000 Pixeln.	106
Abbildung 5-26 TICO-Raman Aufnahme eines Gefrierschnitts derselben Biopsie wie in Abbildung 5-25 und Abbildung 5-24.	107
Abbildung 5-27 TICO-Raman Aufnahme eines Hypopharynxkarzinom im Fingerprint-Bereich von 1500-1800 cm^{-1} aufgenommen mit 64 spektralen Punkten.	109
Abbildung 5-28 Spontanes Ramanspektrum eines Hypopharynxkarzinoms aufgenommen mit 532 nm, 600 l/mm und 25 s Integrationszeit.....	110
Abbildung 5-29 PCA-Ergebnisse der TICO-Raman Daten einen Hypopharynxkarzinoms mit 3 Hauptkomponenten.....	111
Abbildung 5-30 SRS-Mikroskopie mit DFB-Dioden als Abtastlaser.....	114

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hakert, H., et al., *Time-encoded stimulated Raman scattering microscopy of tumorous human pharynx tissue in the fingerprint region from 1500-1800 cm⁻¹*. Opt Lett, 2021. **46**(14): p. 3456-3459.
2. Raman, C.V., *A new radiation*, in *Indian Journal of Physics*. 1928.
3. Argaval, G., *Nonlinear Fiber Optics*. 2001: Academic Express. Chapter 8., p. 247.
4. Maiman, T.H., *Stimulated Optical Radiation in Ruby*. Nature, 1960. **187**(4736): p. 493-494.
5. Laplant, F., et al., *Raman Spectroscopy for Identifying Polymorphs, Raman Spectroscopy for Monitoring Real-Time Processes in the Pharmaceutical Industry, Raman Microspectroscopy and Imaging of Active Pharmaceutical Ingredients in Cells*. Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy. 2007. P. 85-115.
6. Cheng, Q., et al., *Emerging applications of stimulated Raman scattering microscopy in materials science*. Matter, 2021. **4**(5): p. 1460-1483.
7. Carey, P.R. and J. Dong, *Following Ligand Binding and Ligand Reactions in Proteins via Raman Crystallography*. Biochemistry, 2004. **43**(28): p. 8885-8893.
8. Vandenneele, P., *Raman spectroscopy in art and archaeology*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**(8-9): p. 607-609.
9. Candeias, A. and J.M. Madariaga, *Applications of Raman spectroscopy in art and archaeology*. Journal of Raman Spectroscopy, 2019. **50**(2): p. 137-142.
10. Hargreaves, M., et al., *Analysis of Seized Drugs Using Portable Raman Spectroscopy in an Airport Environment - A Proof of Principle Study*. Journal of Raman Spectroscopy, 2008. **39**: p. 873-880.
11. Petersen, M., Z. Yu, and X. Lu, *Application of Raman Spectroscopic Methods in Food Safety: A Review*. Biosensors, 2021. **11**(6).
12. Gaufrès, E., et al., *Hyperspectral Raman imaging using Bragg tunable filters of graphene and other low-dimensional materials*. Journal of Raman Spectroscopy, 2018. **49**(1): p. 174-182.
13. Høgset, H., et al., *In vivo biomolecular imaging of zebrafish embryos using confocal Raman spectroscopy*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 6172.
14. Terhune, R.W., P.D. Maker, and C.M. Savage, *Measurements of Nonlinear Light Scattering*. Physical Review Letters, 1965. **14**(17): p. 681-684.
15. Zumbusch, A., G.R. Holtom, and X.S. Xie, *Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*. Physical Review Letters, 1999. **82**(20): p. 4142-4145.
16. Eckhardt, G., et al., *Stimulated Raman Scattering From Organic Liquids*. Physical Review Letters, 1962. **9**(11): p. 455-457.
17. Lang, G., *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vol. 2. 2006: Springer-Verlag Wien. p. 59.
18. Freudiger, C.W., et al., *Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging*. Lab Invest, 2012. **92**(10): p. 1492-502.
19. Ji, M., et al., *Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy*. Sci Transl Med, 2013. **5**(201): p. 201ra119.
20. Orringer, D.A., et al., *Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy*. Nature Biomedical Engineering, 2017. **1**(2): p. 0027.
21. Ji, M., et al., *Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy*. Science Translational Medicine, 2015. **7**(309): p. 309ra163.
22. Li, J., et al., *Volumetric stimulated Raman scattering imaging of cleared tissues towards three-dimensional chemical histopathology*. Biomedical optics express, 2019. **10**(8): p. 4329-4339.
23. Zhang, L., et al., *Rapid histology of laryngeal squamous cell carcinoma with deep-learning based stimulated Raman scattering microscopy*. Theranostics, 2019. **9**(9): p. 2541-2554.

24. Hollon, T.C., et al., *Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks*. *Nature Medicine*, 2020. **26**(1): p. 52-58.
25. Lee, M., et al., *Recent advances in the use of stimulated Raman scattering in histopathology*. *Analyst*, 2021. **146**(3): p. 789-802.
26. Xiong, H., et al., *Stimulated Raman Excited Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. *Nat Photonics*, 2019. **13**(6): p. 412-417.
27. Chen, X., et al., *Volumetric chemical imaging by stimulated Raman projection microscopy and tomography*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 15117.
28. Gong, L., et al., *Supercritical focusing coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy for high-resolution vibrational imaging*. *Optics Letters*, 2018. **43**: p. 5615.
29. Saar, B.G., et al., *Video-Rate Molecular Imaging in Vivo with Stimulated Raman Scattering*. *Science*, 2010. **330**(6009): p. 1368.
30. Bae, K., et al., *Epi-Detected Hyperspectral Stimulated Raman Scattering Microscopy for Label-Free Molecular Subtyping of Glioblastomas*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(17): p. 10249-10255.
31. Hill, A.H., B. Manifold, and D. Fu, *Tissue imaging depth limit of stimulated Raman scattering microscopy*. *Biomedical optics express*, 2020. **11**(2): p. 762-774.
32. Slipchenko, M.N., et al., *Vibrational imaging of tablets by epi-detected stimulated Raman scattering microscopy*. *Analyst*, 2010. **135**(10): p. 2613-2619.
33. Beier, H.T., G.D. Noojin, and B.A. Rockwell, *Stimulated Raman scattering using a single femtosecond oscillator with flexibility for imaging and spectral applications*. *Optics Express*, 2011. **19**(20): p. 18885-18892.
34. Ozeki, Y., et al., *Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband fiber laser pulses*. *Optics Letters*, 2012. **37**(3): p. 431-433.
35. Ozeki, Y., et al., *High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering*. *Nature Photonics*, 2012. **6**(12): p. 845-851.
36. Freudiger, C.W., et al., *Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy*. *Science*, 2008. **Vol. 322**(Issue. 5909): p. p. 1857-1861.
37. Šulc, J. and H. Jelínková, *5 - Solid-state lasers for medical applications*, in *Lasers for Medical Applications*, H. Jelínková, Editor. 2013, Woodhead Publishing. p. 127-176.
38. Sirleto, L., R. Ranjan, and M.A. Ferrara, *Analysis of Pulses Bandwidth and Spectral Resolution in Femtosecond Stimulated Raman Scattering Microscopy*. *Applied Sciences*, 2021. **11**(9).
39. Zhang, D., M.N. Slipchenko, and J.-X. Cheng, *Highly Sensitive Vibrational Imaging by Femtosecond Pulse Stimulated Raman Loss*. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011. **2**(11): p. 1248-1253.
40. Freudiger, C.W., et al., *Stimulated Raman scattering microscopy with a robust fibre laser source*. *Nat Photon*, 2014. **8**(2): p. 153-159.
41. Figueroa, B., et al., *Broadband hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy with a parabolic fiber amplifier source*. *Biomedical Optics Express*, 2018. **9**(12): p. 6116-6131.
42. Liao, C.-S., et al., *In Vivo and in Situ Spectroscopic Imaging by a Handheld Stimulated Raman Scattering Microscope*. *ACS Photonics*, 2018. **5**(3): p. 947-954.
43. Shin, K.S., et al., *Intraoperative assessment of skull base tumors using stimulated Raman scattering microscopy*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 20392.
44. Liao, C.-S., et al., *Stimulated Raman spectroscopic imaging by microsecond delay-line tuning*. *Optica*, 2016. **3**(12): p. 1377-1380.
45. Fu, D., et al., *Hyperspectral imaging with stimulated Raman scattering by chirped femtosecond lasers*. *J Phys Chem B*, 2013. **117**(16): p. 4634-40.
46. Lin, H., et al., *Microsecond fingerprint stimulated Raman spectroscopic imaging by ultrafast tuning and spatial-spectral learning*. *Nature Communications*, 2021. **12**(1): p. 3052.
47. Bocklitz, T., et al., *Invited Article: Comparison of hyperspectral coherent Raman scattering microscopies for biomedical applications*. *APL Photonics*, 2018. **3**(9): p. 092404.

48. Ji, M., et al., *Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy*. *Science Advances*, 2018. **4**(11): p. eaat7715.
49. Baumgartl, M., et al., *Alignment-free, all-spliced fiber laser source for CARS microscopy based on four-wave-mixing*. *Optics Express*, 2012. **20**(19): p. 21010-21018.
50. Gottschall, T., et al., *Fiber-based source for multiplex-CARS microscopy based on degenerate four-wave mixing*. *Optics Express*, 2012. **20**(11): p. 12004-12013.
51. Huber, R., M. Wojtkowski, and J.G. Fujimoto, *Fourier Domain Mode Locking (FDML): A new laser operating regime and applications for optical coherence tomography*. *Optics Express*, 2006. **14**(8): p. 3225-3237.
52. Wieser, W., et al., *High definition live 3D-OCT in vivo: design and evaluation of a 4D OCT engine with 1 GVoxel/s*. *Biomedical Optics Express*, 2014. **5**(9): p. 2963-2977.
53. Pfeiffer, T., et al., *Ultra low noise Fourier domain mode locked laser for high quality megahertz optical coherence tomography*. *Biomedical Optics Express*, 2018. **9**(9): p. 4130-4148.
54. Klein, T. and R. Huber, *High-speed OCT light sources and systems [Invited]*. *Biomedical Optics Express*, 2017. **8**(2): p. 828-859.
55. Wieser, W., et al., *Multi-Megahertz OCT: High quality 3D imaging at 20 million A-scans and 4.5 GVoxels per second*. *Optics Express*, 2010. **18**(14): p. 14685-14704.
56. Karpf, S., et al., *A Time-Encoded Technique for fibre-based hyperspectral broadband stimulated Raman microscopy*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6784.
57. Karpf, S., et al., *Shot-Noise Limited Time-Encoded Raman Spectroscopy*. *Journal of Spectroscopy*, 2017. **2017**: p. 6.
58. Hakert, H., et al. *Sparse-Sampling with Time-Encoded (TICO) Stimulated Raman Scattering for Fast Image Acquisition*. in *Advances in Microscopic Imaging*. 2017. Munich: Optical Society of America.
59. Evans, C.L., et al., *Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(46): p. 16807.
60. Freudiger, C.W., et al., *Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging*. (1530-0307 (Electronic)).
61. Xie, X.S., & Cheng, J.-X., *Coherent Raman Scattering Microscopy (1st ed.)*. CRC Press. 2012.
62. Evans, C.L. and X.S. Xie, *Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine*. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2008. **1**: p. 883-909.
63. Rigneault, H. and P. Berto, *Tutorial: Coherent Raman light matter interaction processes*. *APL Photonics*, 2018. **3**(9): p. 091101.
64. Owyong, A., *Sensitivity limitations for CW stimulated Raman spectroscopy*. *Optics Communications*, 1977. **22**(3): p. 323-328.
65. Min, W., et al., *Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy*. *Annual review of physical chemistry*, 2011. **62**: p. 507-530.
66. Movasaghi, Z., S. Rehman, and I.U. Rehman, *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007. **42**(5): p. 493-541.
67. Betz, S.F., *Disulfide bonds and the stability of globular proteins*. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 1993. **2**(10): p. 1551-1558.
68. Krafft, C., et al., *Near infrared Raman spectra of human brain lipids*. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 2005. **61**(7): p. 1529-1535.
69. David, C. *Raman spectroscopy of proteins*. [Webinar] 2012 [cited 2021 12/21].
70. Bergholt, M.S., et al., *In vivo diagnosis of esophageal cancer using image-guided Raman endoscopy and biomolecular modeling*. *Technol Cancer Res Treat*, 2011. **10**(2): p. 103-12.
71. Teh, S.K., et al., *Spectroscopic diagnosis of laryngeal carcinoma using near-infrared Raman spectroscopy and random recursive partitioning ensemble techniques*. *Analyst*, 2009. **134**(6): p. 1232-1239.
72. Seng Khoon, T., et al., *Diagnosis of gastric cancer using near-infrared Raman spectroscopy and classification and regression tree techniques*. *Journal of Biomedical Optics*, 2008. **13**(3): p. 1-8.

73. Rygula, A., et al., *Raman spectroscopy of proteins: a review*. Journal of Raman Spectroscopy, 2013. **44**(8): p. 1061-1076.
74. Jacob, C.R., S. Lubner, and M. Reiher, *Analysis of Secondary Structure Effects on the IR and Raman Spectra of Polypeptides in Terms of Localized Vibrations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(18): p. 6558-6573.
75. Stone, N., et al., *Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers*. Faraday Discussions, 2004. **126**(0): p. 141-157.
76. Czamara, K., et al., *Raman spectroscopy of lipids: a review*. Journal of Raman Spectroscopy, 2015. **46**(1): p. 4-20.
77. Vanden-Hehir, S., et al., *Raman Imaging of Nanocarriers for Drug Delivery*. Nanomaterials, 2019. **9**(3).
78. Hill, A.H. and D. Fu, *Cellular Imaging Using Stimulated Raman Scattering Microscopy*. Analytical Chemistry, 2019. **91**(15): p. 9333-9342.
79. Tipping, W.J., et al., *Stimulated Raman scattering microscopy: an emerging tool for drug discovery*. Chemical Society Reviews, 2016. **45**(8): p. 2075-2089.
80. Yamakoshi, H., et al., *Alkyne-Tag Raman Imaging for Visualization of Mobile Small Molecules in Live Cells*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(51): p. 20681-20689.
81. Erik, B., et al., *Live animal myelin histomorphometry of the spinal cord with video-rate multimodal nonlinear microendoscopy*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(2): p. 1-8.
82. Men, Z., et al., *Raman spectra from Symmetric Hydrogen Bonds in Water by High-intensity Laser-induced Breakdown*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 4606.
83. Dolenko, T.A., et al., *Raman Spectroscopy of Water–Ethanol Solutions: The Estimation of Hydrogen Bonding Energy and the Appearance of Clathrate-like Structures in Solutions*. The Journal of Physical Chemistry A, 2015. **119**(44): p. 10806-10815.
84. Gottschall, T., et al., *Fiber-based optical parametric oscillator for high resolution coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy*. Optics Express, 2014. **22**(18): p. 21921-21928.
85. Gottschall, T., et al., *Fiber-based light sources for biomedical applications of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Laser & Photonics Reviews, 2015. **9**(5): p. 435-451.
86. Evans, C.L. *CARS Microscopy for Visualizing Treatment Response in Skin*. in *Optics in the Life Sciences*. 2015. Vancouver: Optical Society of America.
87. Jung, Y., et al., *Longitudinal, 3D in vivo imaging of sebaceous glands by coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: normal function and response to cryotherapy*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(1): p. 39-44.
88. Egawa, M., et al., *Label-free stimulated Raman scattering microscopy visualizes changes in intracellular morphology during human epidermal keratinocyte differentiation*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 12601.
89. Mittal, R., et al., *Evaluation of stimulated Raman scattering microscopy for identifying squamous cell carcinoma in human skin*. Lasers Surg Med, 2013. **45**(8): p. 496-502.
90. Meyer, T., et al., *Multimodal nonlinear microscopic investigations on head and neck squamous cell carcinoma: Toward intraoperative imaging*. Head & Neck, 2013. **35**(9): p. E280-E287.
91. Shin, K.S., et al., *Quantitative chemical imaging of breast calcifications in association with neoplastic processes*. Theranostics, 2020. **10**(13): p. 5865-5878.
92. Lu, F.-K., et al., *Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(37): p. 11624.
93. Pask, H.M., et al., *Ytterbium-doped silica fiber lasers: versatile sources for the 1-1.2 μm region*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 1995. **1**(1): p. 2-13.
94. Eibl, M., et al., *Pulse-to-pulse wavelength switching of a nanosecond fiber laser by four-wave mixing seeded stimulated Raman amplification*. Optics Letters, 2017. **42**(21): p. 4406-4409.
95. Klein, T., et al., *Megahertz OCT for ultrawide-field retinal imaging with a 1050nm Fourier domain mode-locked laser*. Optics Express, 2011. **19**(4): p. 3044-3062.
96. Kolb, J.P., et al., *Megahertz FDML laser with up to 143nm sweep range for ultrahigh resolution OCT at 1050nm*. Proc. SPIE, 2016. **9697**: p. 969703-969703-8.

97. Kolb, J.P., et al., *Full volumetric video rate OCT of the posterior eye with up to 195.2 volumes/s*. Proc. SPIE 2015. **9312**: p. 931202-7.
98. Biedermann, B.R., et al., *Dispersion, coherence and noise of Fourier domain mode locked lasers*. Optics Express, 2009. **17**(12): p. 9947-9961.
99. Pfeiffer, T., et al. *High finesse tunable Fabry-Perot filters in Fourier-domain modelocked lasers*. in Proc.SPIE. 2021.
100. Huber, R., D.C. Adler, and J.G. Fujimoto, *Buffered Fourier domain mode locking: unidirectional swept laser sources for optical coherence tomography imaging at 370,000 lines/s*. Optics Letters 2006. **32**(20): p. 2975-2977.
101. Schmidt, M., et al., *Self-stabilization mechanism in ultra-stable Fourier domain mode-locked (FDML) lasers*. OSA Continuum, 2020. **3**(6): p. 1589-1607.
102. Grill, C., et al., *Beating of two FDML lasers in real time*. SPIE LASE. Vol. 11260. 2020: SPIE.
103. Kraetschmer, T. and S.T. Sanders. *Ultrastable Fourier Domain Mode Locking Observed in a Laser Sweeping 1363.8 – 1367.3 nm*. in *Conference on Lasers and Electro-Optics/International Quantum Electronics Conference*. 2009. Baltimore, Maryland: Optical Society of America.
104. Lotz, S., et al., *Cavity length control for Fourier domain mode locked (FDML) lasers with μm precision*. Biomedical Optics Express, 2021. **12**(5): p. 2604-2616.
105. Kim, K.H., C. Buehler, and P.T.C. So, *High-speed, two-photon scanning microscope*. Applied Optics, 1999. **38**(28): p. 6004-6009.
106. Li, Y.X., et al., *Flexible polygon-mirror based laser scanning microscope platform for multiphoton in-vivo imaging*. J Biophotonics, 2017. **10**(11): p. 1526-1537.
107. Carmichael, H.J., *Spectrum of squeezing and photocurrent shot noise: a normally ordered treatment*. Journal of the Optical Society of America B, 1987. **4**(10): p. 1588-1603.
108. Jung, Y., et al., *Longitudinal, 3D In Vivo Imaging of Sebaceous Glands by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Normal Function and Response to Cryotherapy*. The Journal of investigative dermatology, 2014. **135**.
109. O'Brien, J.S. and E.L. Sampson, *Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin**. Journal of Lipid Research, 1965. **6**(4): p. 537-544.
110. Fu, D., *Quantitative chemical imaging with stimulated Raman scattering microscopy*. Curr Opin Chem Biol, 2017. **39**: p. 24-31.
111. Ji, M., et al., *Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy*. Vol. 4. 2018. eaat7715.
112. Mobaraki, N. and J.M. Amigo, *HYPER-Tools. A graphical user-friendly interface for hyperspectral image analysis*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2018. **172**: p. 174-187.
113. Amigo, J.M., H. Babamoradi, and S. Elcoroaristizabal, *Hyperspectral image analysis. A tutorial*. Analytica Chimica Acta, 2015. **896**: p. 34-51.
114. de Oliveira, M.A.S., et al., *Hyperspectral Raman microscopy can accurately differentiate single cells of different human thyroid nodules*. Biomedical Optics Express, 2019. **10**(9): p. 4411-4421.
115. Zhang, J., et al., *High-Speed Chemical Imaging by Dense-Net Learning of Femtosecond Stimulated Raman Scattering*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2020. **11**(20): p. 8573-8578.
116. Suzuki, Y., et al., *Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(32): p. 15842.
117. Lin, H., et al., *Fingerprint Spectroscopic SRS Imaging of Single Living Cells and Whole Brain by Ultrafast Tuning and Spatial-Spectral Learning*. 2020.
118. Lavalley, J.C. and N. Sheppard, *Anharmonicity of CH_3 deformation vibrations and Fermi resonance between the symmetrical CH_3 stretching mode and overtones of CH_3 deformation vibrations*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1972. **28**(11): p. 2091-2101.
119. Stone, N., et al., *Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers*. Faraday Discuss, 2004. **126**(1359-6640 (Print)): p. 141-57; discussion 169-83.

120. Ruiz-Chica, A.J., et al., *Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine–cytosine and adenine–thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2004. **35**(2): p. 93-100.
121. Huang, Z., et al., *Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(6): p. 1047-52.
122. Guo, S., et al., *Modified PCA and PLS: Towards a better classification in Raman spectroscopy–based biological applications*. *Journal of Chemometrics*, 2020. **34**(4): p. e3202.
123. Ong, Y.H., M. Lim, and Q. Liu, *Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells*. *Optics Express*, 2012. **20**(20): p. 22158-22171.
124. Kong, C., et al., *High-contrast, fast chemical imaging by coherent Raman scattering using a self-synchronized two-colour fibre laser*. *Light: Science & Applications*, 2020. **9**(1): p. 25.
125. Lu, F.-K., et al., *Multicolor stimulated Raman scattering microscopy*. *Molecular Physics*, 2012. **110**(15-16): p. 1927-1932.
126. Mura, F., et al., *Surgical treatment of hypopharyngeal cancer: a review of the literature and proposal for a decisional flow-chart*. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 2013. **33**(5): p. 299-306.
127. Konorov, S.O., et al., *Evidence of marked glycogen variations in the characteristic Raman signatures of human embryonic stem cells*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011. **42**(5): p. 1135-1141.
128. Czamara, K., et al., *Unsaturated lipid bodies as a hallmark of inflammation studied by Raman 2D and 3D microscopy*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 40889.
129. Singh, S.P., et al., *Identification of early inflammatory changes in the tympanic membrane with Raman spectroscopy*. *Analyst*, 2019. **144**(22): p. 6721-6728.
130. Eibl, M., et al. *Pulse-to-pulse wavelength switching of diode based fiber laser for multi-color multi-photon imaging*. in *Proc. SPIE 10083*. 2017.

9 EIGENE PUBLIKATIONEN

1. **Hubertus Hakert**, Matthias Eibl, Marie Tillich, Ralph Pries, Gereon Hüttmann, Ralf Brinkmann, Babara Wollenberg, Karl Ludwig Bruchhage, Sebastian Karpf, and Robert Huber, "Time-encoded stimulated Raman scattering microscopy of tumorous human pharynx tissue in the fingerprint region from 1500-1800 cm^{-1} ," *Opt Lett* **46**, 3456-3459 (2021).
2. Jan Philip Kolb, Matthias Eibl, Daniel Weng, **Hubertus Hakert**, Wolfgang Draxinger, Nadine Merg, Ralf Brinkmann, Reginald Birngruber, Jennifer Hundt, Sebastian Karpf, and Robert Huber, "Fiber-Based Sub-Nanosecond Two-Photon Microscopy for Virtual H&E Histology," European Conference on Biomedical Optics (ECBO) (2019).
3. Daniel. Weng, **Hubertus. Hakert**, Torben. Blömker, Jan. Philip. Kolb, Matthias. Strauch, Matthias. Eibl, Phillip. Lamminger, Sebastian. Karpf, and Robert. Huber, "Sub-Nanosecond Pulsed Fiber Laser for 532nm Two-Photon Excitation Fluorescence (TPEF) Microscopy of UV Transitions," in *2019 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC)*(2019), pp. 1-1.
4. Jan Philip Kolb, Daniel Weng, **Hubertus Hakert**, Matthias Eibl, Wolfgang Draxinger, Tobias Meyer, Thomas Gottschal, Ralf Brinkmann, Reginald Birngruber, Jürgen Popp, Jens Limpert, Sebastian Karpf, and Robert Huber, "Virtual HE histology by fiber-based picosecond two-photon microscopy," in *Proc.SPIE*(2019).
5. **Hubertus Hakert**, Matthias Eibl, Sebastian Karpf, Barbara Wollenberg, Ralph Pries, and Robert Huber, "Label-free imaging of tumorous tissue in the Raman fingerprint region with time-encoded (TICO) stimulated Raman scattering (Conference Presentation)," in *Proc.SPIE*(2019).
6. Matthias Eibl, Daniel Weng, **Hubertus Hakert**, Jan. Philip. Kolb, Tom Pfeiffer, Jennifer Hundt, Robert Huber, and Sebastian Karpf, "Wavelength agile multi-photon microscopy with a fiber amplified diode laser," *Biomedical Optics Express* **9**, 6273-6282 (2018).
7. Jan. Philip. Kolb, Tom Pfeiffer, Matthias Eibl, **Hubertus Hakert**, and Robert Huber, "High-resolution retinal swept source optical coherence tomography with an ultra-wideband Fourier-domain mode-locked laser at MHz A-scan rates," *Biomedical Optics Express* **9**, 120-130 (2018).
8. Matthias Eibl, Sebastian Karpf, **Hubertus Hakert**, Daniel Weng, Torben Blömker, and Robert Huber, "Pulse-to-pulse wavelength switching of diode based fiber laser for multi-color multi-photon imaging," in *Proc. SPIE 10083*(2017), p. 100831C.
9. Matthias Eibl, Sebastian Karpf, Daniel Weng, **Hubertus Hakert**, Tom Pfeiffer, Jan. Philip. Kolb, and Robert Huber, "Single pulse two photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate," *Biomedical Optics Express* **8**, 3132-3142 (2017).
10. **Hubertus Hakert**, Matthias Eibl, Sebastian Karpf, and Robert Huber, "Sparse-Sampling with Time-Encoded (TICO) Stimulated Raman Scattering for Fast Image Acquisition," in *Advances in Microscopic Imaging*(Optical Society of America, Munich, 2017), p. 1041408.

10 BETREUTE ARBEITEN

1. Bachelorarbeit von Leon Kerkau "Realisierung eines Laserverstärkungssystems mit einstellbarer Wellenlänge für moderne Raman-Spektroskopie" Universität zu Lübeck 2020
2. Bachelorarbeit von Marie Tillich "Vergleichsstudie zwischen spontaner Raman-Spektroskopie und zeitcodierter-Raman-Mikroskopie" Universität zu Lübeck 2020

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Alternating current
ADC	Analog Digital Converter
ASE	Amplified Spontaneous Emission
AWG	Arbitrary Waveform Generator
BC	Beam Combiner
BI	Back Illuminated
BW	Bandwidth
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Scattering
CCD	Charged Coupled Device
CSRS	Coherent Stokes Raman Scattering
CW	Continuous Wave
DC	Duty Cycle
DFB	Distributed Feedback Laser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EM	Electron Multiplying
ENOB	Effective Number of Bits
EOM	Electro Optic Modulator
FBG	Fiber Bragg Grating
FDML	Fourier Domain Mode Locked
FFP-TF	Fiber Fabry Perot- Tunable Filter
FI	Front Illuminated
FOV	Field Of View

FW	Foward
FWM	Four Wave Mixing
HE	Hematoxylin Eosin
HK	Hauptkomponente
HP	High Power
LDC	Laser Diode Controller
LLF	Laser Line Filter
LUT	Look Up Table
MFD	Mode Field Diameter
MOPA	Master Oscillator Power Amplifier
NA	Numerische Apertur
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NI	National Instruments
OCT	Optische Kohärenz Tomografie
OPO	Optisch Parametischer Oszillator
OSA	Optical Spectrum Analyzer
PCA	Principle Component Analysis
PDT	Pixel-dwell-time
PG	Pulsgenerator
PLL	Phase Locked Loop
PM	Polarization Maintaining
PMMA	Polymethylmethacrylat
QE	Quanteneffizienz
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
PS	Polystyrol

RT	Rise Time
SHG	Second Harmonic Generation
SNR	Signal to Noise Ratio
SOA	Semiconductor Optical Amplifier
SP	Spektraler Punkt
SRG	Stimulated Raman Gain
SRL	Stimulated Raman Loss
SRS	Stimulierte Ramanstreuung
SS	Sparse Sampling
TICO	Time encoded
TiSa	Titan Saphir
TTL	Transistor Transistor Logic
VCS	Voice Coil Stage
WDM	Wavelength Division Multiplexer
XPM	Cross Phase Modulation
YDF	Ytterbium dotierte Faser
YDFV	Ytterbium dotierter Faser-Verstärker
WDM	Wavelength Division Multiplexer

12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gilt Prof. Robert Huber, der es mir ermöglicht hat in seiner Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit anzufertigen. Neben der sehr guten Betreuung möchte ich seine Freude am Vermitteln von Wissen hervorheben. Die aufgetretenen Fragen und Herausforderungen wurden zeitnah gelöst und diskutiert. Dabei wurde mein Wissen auch außerhalb des eigenen Projekts erweitert und gefestigt. Zu guter Letzt möchte ich das freundschaftliche Miteinander hervorheben, das stets für eine entspannte Arbeitsatmosphäre gesorgt hat.

Ein großer Dank gilt Prof. Sebastian ‚Nino‘ Karpf für seine Unterstützung, Betreuung und Motivation. Auch seine Vorarbeit als Doktorand im Bereich der TICO-Raman Mikroskopie waren unerlässlich für die Weiterentwicklung des TICO-Raman Konzepts.

Zudem möchte ich die gute Vernetzung zwischen dem Medizinischen Laserzentrum Lübeck und dem BMO hervorheben und mich an dieser Stelle bei Dr. Ralf Brinkmann für die Zeit am MLL bedanken.

Als technologieorientierte Arbeitsgruppe mit dem Fokus auf Laser- und Mikroskopieentwicklung hätten wir ohne das Interesse und die Unterstützung der klinischen Institute weniger Anwendungsmöglichkeiten unserer Forschungsergebnisse. Hierbei möchte ich mich bei Prof. Jennifer Hundt vom Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie und Dr. Ralph Pries der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des UKSH Lübecks bedanken. Neben den, nach meinen Wünschen präparierten zur Verfügung gestellten Proben, konnten allerlei Fragen auf kurzem Weg beantwortet werden.

In meiner Anfangszeit als Masterstudent und junger Doktorand war Matthias Eibl besonders beteiligt. Neben der guten fachlichen Betreuung demonstrierte er mir, wie emotional aufgeladen wissenschaftliches Arbeiten sein kann.

Trotz meiner Alleinstellung als Doktorand auf dem TICO-Raman Projekt möchte ich mich für den regen Austausch und die gegenseitige moralische Unterstützung bei Torben Blömker bedanken. Die meisten Zweiphotonen- und OCT-Anwender sind förmlich in ihrem Messsignal ertrunken, wohingegen wir „Raman forschenden“ um jedes Photon gekämpft haben.

Weiterer Dank gilt Christin Grill und Simon Lange. Sie stellten mir bereitwillig ihre FDML-Laser zur Verfügung, um Messungen im Fingerprintbereich durchführen zu können. Zudem geben Sie mir bereitwillig Auskunft rund ums Thema FDML-Laser.

Im Allgemeinen möchte ich mich bei der gesamten AG-Huber und AG-Karpf für die kollegiale und freundliche Stimmung bedanken. Auch arbeitsgruppenübergreifend gibt es, trotz der räumlichen Trennung zum Rest des BMOs und MLLs, ein freundliches und nettes Miteinander.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Freundin Saskia danken. Ohne ihre Unterstützung wäre mein bisheriger Weg an der Universität anders verlaufen. Sie hat ohne fachlichen Bezug zu nehmen einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit, indem sie mir den Rücken stärkte und zur rechten Zeit mahnend auf mich einwirkte.