

Entwicklung eines schnellen Raman- Mikrospektrometers und theoretische Untersuchung von geschwindigkeits- begrenzenden Faktoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

Vorgelegt dem Rat der Physikalisch-Astronomischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. Walter Müller

geboren am 06.12.1988 in Erfurt

Gutachter:

1. Gutachter: **Herr Prof. Dr. rer. nat. Rainer Heintzmann**, Institut für Physikalische Chemie (IPC), Friedrich-Schiller-Universität Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena und Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT), Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena

2. Gutachter: **Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Christoph Cremer**, Kirchhoff-Institut für Physik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 227, 69120 Heidelberg, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und Institut für Molekulare Biologie (IMB) Mainz

3. Gutachter: **Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Richard Kowarschik**, Institut für Angewandte Optik (IAO), Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fröbelstieg 1, 07743 Jena

Tag der Disputation: 09.05.2017

I. Danksagung

Für die Bereitstellung des Arbeitsthemas: „Moderne Methoden der Raman-Mikroskopie“, den Vorschlag Raman-Mikroskopie und Lichtschichtbeleuchtung miteinander zu verbinden, die aufmerksame Betreuung und die Möglichkeit, frei Mittel zur Realisierung einsetzen zu können bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rainer Heintzmann, bei Herrn apl. Prof. Dr. Michael Schmitt und bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Popp.

Herrn Dr. Christian Matthäus danke ich für die Unterstützung bei der Mikroskopie eines fixierten Zebrafischembryos an einem konfokalen Raman-Mikroskop WITec $\alpha 300$ am Universitätsklinikum Jena.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Biomedizinische Bildgebung“ des Leibniz-Instituts für Photonische Technologien und des Instituts für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank richtet sich dabei an:

Herrn Dr. Martin Kielhorn für Diskussionen und praktische Hinweise, die unter anderem in einer gemeinsamen Patentanmeldung mit Herrn Prof. Dr. Rainer Heintzmann mündeten,

Herrn M.Sc. Ronny Förster für wertvolle Diskussionen in theoretischer Mikroskopie,

Frau M.Sc. Sapna Shukla für Hinweise bei der englischsprachigen Publikation,

Herrn Dr. Ulrich Leischner für Vorschläge bei der Umsetzung eines eigenen Lichtschichtmikroskops,

Frau Benita Göbel für die Unterstützung bei der Literaturrecherche,

Herrn Matthias Arnz für das geduldige Abschleifen der beiden 3“-Retroreflektoren und

an die Herren Dipl.-Ing. (FH) Thomas Büttner und Dipl.-Ing. (FH) Robert Kretschmer für die Unterstützung bei der Herstellung von mechanischen Komponenten des Versuchsaufbaus.

Herrn Dr. Christian Liutik vom Patentinformationszentrum der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die Unterstützung bei der Patentanmeldung.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Carl-Zeiss-Stiftung.

II. Abstract

Bildgebende Raman-Mikrospektroskopie ist eine weit verbreitete Möglichkeit, die chemische Zusammensetzung von Proben zerstörungsfrei zu untersuchen. Hyperspektrale Raman-Bilder werden dabei häufig durch punktweise, sequenzielle Messung von Streulichtspektren mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops aufgenommen. Der geringe Wirkungsquerschnitt für die spontane Raman-Streuung erfordert für ausreichende Signalqualität eine hohe Beleuchtungsenergie. Die niedrige Zerstörschwelle von biologischen Proben verbietet jedoch gleichzeitig hohe Bestrahlungsstärken. Die Belichtungszeit für ein einzelnes Spektrum kann dadurch im Sekundenbereich liegen, was die Methode für viele zeitabhängige Anwendungen bislang unattraktiv macht. Zur Verbesserung der Geschwindigkeit wurden vor und zeitgleich zu dieser Arbeit verschiedene Methoden der Parallelisierung, z.B. zeilenweise abtastende Verfahren, entwickelt.

Bislang nicht gelungen war die Kombination von hyperspektraler Bildgebung mit der aus der Fluoreszenzmikroskopie bewährten Lichtschichtbeleuchtung. Zudem sind die Mechanismen, die zur Zerstörung der Probe führen bei den bisherigen Ansätzen weitgehend unberücksichtigt geblieben. Dies hat zu der Fehlvorstellung geführt, dass der Geschwindigkeitsgewinn ausschließlich mit dem Grad der Parallelisierung des Abtastprozesses verbunden sei.

In dieser Arbeit wird ein Raman-Mikrospektrometer basierend auf einem neuen bildgebenden Fourier-Transformations-Spektrometer und einer Lichtschichtbeleuchtung entwickelt. Dieses wird einem konfokalen Raman-Mikrospektrometer nach dem Stand der Technik gegenübergestellt. Außerdem werden die physikalischen Geschwindigkeitsgrenzen von Raman-Mikrospektroskopie für verschiedene Mikrospektrometertypen in einer theoretischen Betrachtung bestimmt und verglichen.

Mit dem entwickelten Raman-Mikrospektrometer kann ein hyperspektrales Raman-Bild von einer Polymerprobe, bestehend aus über 4 000 000 Spektren und einer spektralen Auflösung von $4,4 \text{ cm}^{-1}$, in unter 14 min aufgezeichnet werden. Das zum Vergleich herangezogene konfokale Raman-Mikrospektrometer benötigt mit der schnellsten Abtastgeschwindigkeit für die gleiche Aufgabe 213-mal länger, also über zwei Tage. Außerdem wird mit der Neuentwicklung ein Volumen einer Zebrafischprobe aus 50 Ebenen mit voller spektraler Information aufgezeichnet. Bei vergleichbarer Abbildungsqualität ist das entwickelte Raman-Mikrospektrometer noch immer 5,3-mal schneller als das konfokale.

Basierend auf diesen praktischen Erkenntnissen werden die Signalentstehung in Mikrospektrometern verschiedenen Typs und der Einfluss der Beleuchtung auf die Probe theoretisch untersucht. Im Ergebnis können die Geschwindigkeiten bei gleicher Bildqualität für konfokale, linienkonfokale, Weitfeld-, Lichtschicht-Raman-Mikroskope und ein Mikroskop mit einer Lichtlinienbeleuchtung für die Vermessung biologischer Proben verglichen werden. Es zeigt sich, dass die gleichzeitige Beleuchtung von mehreren Probenpunkten aus thermischen Gründen eine Drosselung der Bestrahlungsstärke erzwingt. Dadurch werden die Geschwindigkeitsvorteile der Parallelisierung nivelliert. Der theoretische Vergleich bestätigt den Geschwindigkeitsgewinn des in dieser Arbeit entwickelten Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers gegenüber dem konfokalen und weist die Richtung für künftige Techniken zur weiteren, deutlichen Geschwindigkeitssteigerung auf.

Die gewonnenen Erkenntnisse können über Raman-Anwendungen hinaus auf andere Arten der Mikroskopie und Mikrospektroskopie, bei denen die Arbeitsgeschwindigkeit durch die Zerstörschwelle der Probe limitiert ist, übertragen werden.

III. Abkürzungsverzeichnis

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy
CFI	Chrome Free Infinity
CMOS	Complimentary Metall Oxid Semiconductor
CTF	Coherent Transfer Function
CSF	Coherent Spread Function
FEM	Finite-Elemente-Methode
FOV	Field Of View
FT	Fourier-Transformation
FTS	Fourier-Transformations-Spektroskopie
FWHM	Full Width at Half Maximum
GFP	Green Fluorescent Protein
ICA	Independent Component Analysis
ICS	Infinity Color Corrected System
IF	Integral Feld
IR	Infrarot
LSFM	Light Sheet Fluorescence Microscopy
LSRM	Light Sheet Raman Micro Spectroscopy
NA	Numerische Apertur
NMF	Nicht-negative Matrix Faktorisierung
o.B.d.A.	ohne Beschränkung der Allgemeinheit
OPD	Optische Pfadlängendifferenz
OPSL	Optically Pumped Semiconductor Laser
OTF	Optical Transfer Function
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
PDE	Partial Differential Equation Toolbox
PDGL	Partielle Differentialgleichung
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
PSF	Point Spread Function
RMS	Root Mean Square
ROI	Region Of Interest
RR	Resonance Raman
sCMOS	scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SIM	Structured Illumination Microscopy
SNR	Signal to Noise Ratio
SPIM	Selective Plane Illumination Microscopy
UIS	Universal Infinity System
WD	Working Distance

IV. Mathematische Operatoren

-	komplexe Konjugation	$z = a + ib \rightarrow \bar{z} = a - ib$
\Re	Realteil	$a = \Re(a + ib)$
\Im	Imaginärteil	$b = \Im(a + ib)$
arg	Argument	$\varphi = \arg(r \cdot e^{i\varphi})$
$\ \cdot\ $	Norm	$\ \vec{r}\ ^2 = \sum_{k=1}^n r_k^2$
$\langle \cdot \cdot \rangle$	Standardskalarprodukt	$\langle x y \rangle = \sum_{k=1}^n x_k y_k$
$\vec{\nabla}$	Nabla	$\left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)$
∇^2	Laplace	$\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$
\otimes	Faltung	$(f \otimes g)(\vec{r}) = \int_{\mathbb{R}^n} f(\vec{r}') \cdot g(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}'$
\star	Kreuzkorrelation	$(f \star g)(\vec{r}) = \int_{\mathbb{R}^n} \bar{f}(\vec{r}') \cdot g(\vec{r} + \vec{r}') d\vec{r}'$
\mathcal{F}	Fourier-Transformation	$\mathcal{F}\{u(\vec{r})\}(\vec{k}) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^{\frac{n}{2}} \int_{\mathbb{R}^n} u(\vec{r}) \cdot e^{-i\vec{k}\cdot\vec{r}} d\vec{r}$
\mathcal{F}^{-1}	inverse Fourier-Transformation	$\mathcal{F}^{-1}\{u(\vec{k})\}(\vec{r}) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^{\frac{n}{2}} \int_{\mathbb{R}^n} u(\vec{k}) \cdot e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d\vec{k}$

V. Inhalt

I.	Danksagung	3
II.	Abstract	4
III.	Abkürzungsverzeichnis	6
IV.	Mathematische Operatoren	7
V.	Inhalt	8
1.	Einführung	10
2.	Entwicklung eines Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers.....	16
2.1.	Wahl der Komponenten	16
2.1.1.	Die Mikroskopobjektive und deren Anordnung	16
2.1.2.	Der Laser	17
2.1.3.	Die Kamera.....	18
2.2.	Dimensionierung und Erzeugung der Lichtschicht	18
2.3.	Das bildgebende Fourier-Transformations-Spektrometer	22
2.3.1.	Aufbau des Interferometers	23
2.3.2.	Mechanische Eigenschaften des Interferometers	25
2.3.3.	Optische Eigenschaften des Interferometers	26
2.3.4.	Allgemeine geometrische Eigenschaften des Interferometers	26
2.3.5.	Geometrische Eigenschaften des Interferometers im Mikroskop	28
2.3.6.	Aktive Stabilisierung der optischen Pfaddifferenz (OPD)	29
2.3.7.	Abtastung der Streulichtinterferogramme	32
2.4.	Das Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometer	34
2.5.	Die Präparation von Proben	35
2.6.	Bilddatenverarbeitung	36
2.6.1.	Erzeugung von Spektren aus Interferogrammen	36
2.6.2.	Korrektur der Spektren	38
2.6.3.	Reduzierung des Schattenwurfs in der LSRM	44
2.6.4.	Darstellung der spektralen Daten	45
2.7.	Ergebnisse	50
2.7.1.	Polymerproben	50
2.7.2.	Volumenbildgebung an einem Zebrafischembryo	52
2.8.	Vergleich von LSRM und konfokaler Raman-Mikrospektroskopie	55
2.9.	Diskussion	58
3.	Signal- und Geschwindigkeitsgrenzen in der Mikrospektroskopie	61
3.1.	Signalerzeugung in einem allgemeinen Mikroskop	63
3.1.1.	Das Signal am Detektor	64
3.1.2.	Abbildung mit der Detektionsoptik	65

3.1.3.	Raman-Streuung der Probe	65
3.1.4.	Die Beleuchtung der Probe	66
3.1.5.	Abbildung mit dem ganzen Mikroskop	67
3.1.6.	Modellierung verschiedener Mikroskope mit gaußscher Strahlenoptik	69
3.2.	Signal-Rausch-Verhältnisse verschiedener Spektrometer	70
3.2.1.	Einteilung bildgebender Spektrometer	70
3.2.2.	StrahlungsCODIERUNG mit einem allgemeinen Spektrometer	71
3.2.3.	Das absolute Signal eines 2D bildgebenden Spektrometers.....	73
3.2.4.	Das relative Signal eines bildgebenden Spektrometers.....	74
3.2.5.	Das absolute SNR eines bildgebenden Spektrometers	75
3.2.6.	Das relative SNR eines bildgebenden Spektrometers.....	77
3.3.	Einfluss der Beleuchtung auf eine Probe	80
3.3.1.	Beleuchtung einer Probe.....	80
3.3.2.	Zerstörung einer Probe durch zu hohe Temperaturen	81
3.4.	Wärmediffusion in einer Probe	83
3.4.1.	Die Temperaturentwicklung ohne Diffusion	86
3.4.2.	Die freie Diffusion.....	87
3.4.3.	Die Temperaturverteilung im thermisch stationären Zustand	91
3.4.4.	Die begrenzte Diffusion.....	92
3.4.5.	Vergleich der Temperaturfaktoren verschiedener Beleuchtungsgeometrien.....	95
3.5.	Vergleich verschiedener Mikrospektrometertypen.....	97
3.5.1.	Beispiel: Weitfeldmikroskop mit veränderlichem Bandfilter.....	99
3.5.2.	Ergebnisse des Vergleichs	100
3.6.	Diskussion	102
4.	Zusammenfassung	104
5.	Anhang	105
6.	Literaturverzeichnis.....	126
7.	Abbildungsverzeichnis.....	133
8.	Tabellenverzeichnis.....	138
9.	Ehrenwörtliche Erklärung	139

1. Einführung

Um die Struktur und das Verhalten von biologischem Gewebe zu erkennen und zu verstehen ist es nötig, möglichst umfangreiche Information über dieses zu sammeln ohne es dabei zu beeinflussen oder gar zu zerstören. Eine Möglichkeit chemische Eigenschaften eines kompletten Probenvolumens orts aufgelöst zu beliebigen Zeiten erfassen zu können, wäre ideal. Die Raman-Mikrospektroskopie ist eine Methode, die diesem Ideal sehr nahe kommt [1].

Raman-Mikrospektroskopie basiert auf der Raman-Streuung, einem unelastischen Streuprozess von Licht an Materie [1], [2]. Bei diesem wird zwischen dem anregenden Licht und den mechanischen Rotations- und Schwingungsfreiheitsgeraden der Moleküle Energie übertragen, sodass das emittierte Streulicht zu höheren (nach Blau, Anti-Stokes) bzw. niedrigeren Frequenzen (nach Rot, Stokes) verschoben wird. Der Betrag dieser Verschiebung hängt von der Frequenz der mechanischen Molekülschwingung, nicht aber von der Frequenz der Anregung ab. Die Verschiebung wird häufig in Wellenzahlen bezüglich der Anregung mit der Maßeinheit inverser Zentimeter (cm^{-1}) angegeben (siehe Anhang A1.). Typischerweise sind Wellenzahlverschiebungen bis 4000 cm^{-1} zu erwarten. Die Überlagerung mehrerer mechanischer Schwingungen führt zu einem komplizierten aber für eine chemische Verbindung spezifischen Spektrum, welches diese in Stoffgemischen wieder auffindbar macht. Eine Voraussetzung für Raman-Streuung ist die Kopplung der Polarisierbarkeit eines Moleküls an mechanische Freiheitsgrade. Da typische Streuquerschnitte für Raman (z.B. $7,5 \cdot 10^{-30}\text{ cm}^2\text{ sr}^{-1}$ für ein einzelnes Wassermolekül bei 550 nm [3]) millionenfach geringer sind als jene für Rayleigh-Streuung (elastische Streuung) oder Fluoreszenz, ist Raman-Streuung in der Regel nicht mit bloßem Auge sichtbar.

Ein typisches Raman-Mikrospektrometer besteht aus einer monochromatischen Lichtquelle zur Anregung (Laser), einem Träger für die Probe, einem steilen Filter gegen Rayleigh gestreutes Licht und einem Lichtspektrometer zur Analyse des Stokes verschobenen, Raman gestreuten Lichtes [1] (siehe Abbildung 1). In Kombination mit einer Abbildungsoptik können Raman-Spektren für verschiedene Punkte in der Probe unabhängig voneinander aufgenommen werden. So lassen sich mit einem konfokalen Raman-Mikroskop [4] entsprechend des Standes der Technik örtlich sequenziell ganze hyperspektrale Bilder erzeugen.

Nach einer geeigneten Datenverarbeitung können chemische Volumenkarten von heterogenen biologischen Strukturen erzeugt werden. Da diese Technik nicht mit einer aufwändigen Präparation, wie dem Anfärben bestimmter chemischer Strukturen, verbunden ist, was wiederum einen chemischen Eingriff in die Probe bedeuteten würde, gewinnt sie für die biochemische Forschung und medizinische Diagnostik zunehmend an Bedeutung [5], [6].

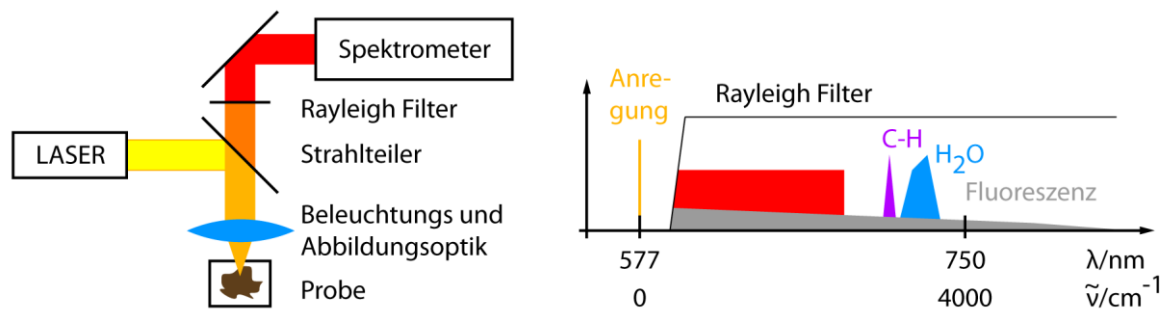


Abbildung 1: links: Typischer Aufbau eines Raman-Mikrospektrometers, rechts: schematisches Raman-Spektrum mit spektralen Bändern für biologisches Gewebe

Die mit einem kommerziellen konfokalen Raman-Mikroskop ermittelten Parameter bei der Messung eines einzigen Punktes einer biologischen Probe zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Typische Parameter bei der Messung mit einem konfokalen Raman-Mikroskop.

Probe	Auge eines Zebrafischembryos in Wasser
Mikroskop	WITec α 300
Objektiv	60 \times 1,0 NA Wasser
Anregungswellenlänge	532 nm
Probenfläche (FWHM)	0,06 μm^2
Signal-Rausch-Verhältnis (SNR)	21 : 1
Bestrahlungsstärke	1,3 mW/ μm^2
Belichtungszeit	10 s

Die verwendete lokale Bestrahlungsstärke im Fokus entspricht dem millionenfachen der natürlichen Sonneneinstrahlung, für die biologisches Leben typischerweise ausgelegt ist. Mit den gegebenen Parametern werden zur Erzeugung eines recht kleinen hyperspektralen Bildes der Probe mit 100 \times 100 Bildpunkten 28 Stunden benötigt. An diesem einfachen Zahlenbeispiel wird sofort sichtbar, an welchen Stellen diese Technik weiter zu entwickeln ist, um sie in noch mehr Gebieten der Lebenswissenschaften einsetzbar zu machen.

Diese Arbeit stellt sich die Aufgabe, neue Möglichkeiten zur Senkung der Anregungsleistung, zur Beschleunigung des Abtastprozesses bei stets guter Bildqualität und die diesbezüglichen Grenzen zu finden.

Es gibt derzeit verschiedene Ansätze, die ausgewählte Parameter dramatisch verbessern können, was aber meist zu Lasten der Tauglichkeit für biologische Proben geht.

So lässt sich mit Hilfe der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (Surface Enhanced Raman Spectroscopy SERS) durch elektromagnetische Kopplung der Moleküle an Oberflächenplasmonen auf Metalloberflächen eine Vergrößerung des Streuquerschnittes von 10^{10} und somit Einzelmolekülsensitivität erreichen [7]–[9]. Hierfür müssen jedoch zunächst Metallnanopartikel in die Probe eingebracht werden, was den wesentlichen Vorteil der Raman-

Mikrospektroskopie, Untersuchungen ohne die Verwendung von Markern durchführen zu können, zunichte macht. Außerdem hängt die Verstärkung sehr stark vom Abstand zwischen Molekül und Metalloberfläche ab, was sich negativ auf die Reproduzierbarkeit auswirkt.

Ein weiterer Ansatz ist die Nutzung des Resonanz-Raman-Effekts (Resonance Raman RR). Hier wird die Anregung der Probe nahe oder genau gleich eines elektronischen Übergangs gewählt, was mit Absorption verbunden ist. Dadurch erhöht sich die Lebensdauer des elektronischen Zustands über den gestreut wird und damit die Wahrscheinlichkeit für die Raman-Streuung. In der Literatur werden Vergrößerungen der Streuquerschnitte von 10^6 benannt [1]. Durch RR werden jedoch nur Schwingungen des elektronisch resonanten Chromophors verstärkt, was zu einer Selektivität für bestimmte Moleküle und Bindungen führt. Dies kann ein Vorteil bei der Suche von konkreten chemischen Strukturen sein, ist bei der Gewebediagnostik, bei der es um die Sichtbarkeit aller chemischen Substanzen und eine automatisierte spektrale Auswertung geht, eher ein Nachteil. Da RR intrinsisch mit Absorption verbunden ist, verringert sich die Eindringtiefe in die Probe und die thermische Last steigt mit dem Signalgewinn, was zu Schäden führt und das Verfahren wieder unattraktiv für breitbandige biologische Anwendungen macht. Gleichzeitig mit der Absorption steigt die Autofluoreszenz, die auch das verstärkte RR-Signal überdecken kann.

Neben spontaner Raman-Streuung lässt sich auch die nichtlineare Raman-Streuung für die Spektroskopie benutzen. Ein prominenter Vertreter ist die kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy CARS) [10]. Hier wird die Anti-Stokes Raman-Streuung kohärent durch Strahlung zweier Laser bei unterschiedlicher Frequenz erzwungen. Dieses Verfahren wird erfolgreich in der Medizintechnik eingesetzt [11]. Das Erzeugen voller Spektren, wie es die spontane Raman-Streuung direkt ermöglicht, ist so jedoch sehr aufwändig [12], [13] und schwerer zu interpretieren. Während sich das gesamte Signal der spontanen Raman-Streuung als inkohärente Addition der Signale der einzelnen Moleküle ergibt, entsteht das CARS-Signal durch kohärente Addition. Ist die für CARS nötige Phasenanpassung erfüllt, wachsen die Amplitude des CARS-Signals linear und die Leistung quadratisch mit dem optischen Weg bzw. der Molekülkonzentration. Durch die hohen numerischen Aperturen, welche für hochauflösende Mikroskopie notwendig sind, ist diese Phasenanpassung leicht erfüllt, jedoch nur für die Länge einzelner Wellenzüge. Somit sinkt der Signalvorteil durch die kohärente Addition. Gleichzeitig kann jedoch das inkohärente Hintergrundsignal das Nutzsignal überdecken.

Um chemische Volumenkarten von biologischen Proben zu erzeugen, lohnt es sich somit weiterhin nach effizienten und schnellen Techniken für die spontane Raman-Spektroskopie zu suchen. Als Lösung scheint die Parallelisierung der Messung vor dem Hintergrund langer Punktmesszeiten geradezu auf der Hand zu liegen.

Ein Ansatz sind zeilenweise abtastende Mikroskope, die mit einer konfokalen Spaltblende und einem zweidimensionalen Spektrometer ausgestattet sind [14]–[16]. Dabei suggerieren auch aktuelle Publikationen, dass es eine feste, an eine bestimmte Bestrahlungsstärke gebundene Zerstörungsschwelle biologischer Proben gäbe, die nicht überschritten werden darf:

„However, the small spontaneous Raman scattering cross-section of biological samples, coupled with severe limits on laser power density ($\sim 2 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$), leads to long pixel imaging times. In general, at least 100 ms of laser dwelling time is needed for a pixel volume of $\sim 1 \mu\text{m}^3$.“ (bezogen auf 785 nm) [16]

Die einfache Schlussfolgerung daraus ist ein Zuwachs an Geschwindigkeit proportional zum Grad der Parallelisierung. Mit dem Beispiel aus Tabelle 1 lässt sich durch parallele Beleuchtung mit einem Spalt und zeilenweise Abtastung leicht ein Faktor 100 erreichen. Die etwas reduzierte Auflösung, die ein linienkonfokales System mit sich bringt, scheint bei diesem Gewinn zu verblasen.

Vor diesem Eindruck ist der erste Teil dieser Arbeit entstanden. Die Idee dabei war nicht nur eine Linie, sondern gleich eine ganze Bildebene gleichzeitig zu beleuchten und zu vermessen. Als besonders elegant erschien dabei die Lichtschichtbeleuchtung [17], eine spezielle Form der Dunkelfeldbeleuchtung, deren Wurzeln in das Jahr 1903 zurück reichen [18]. Wiederentdeckt wurde die Methode für die Fluoreszenzmikroskopie als „Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning“ [19]–[21], wo sie sich dem Ruf, besonders schonend für die Probe zu sein, erfreut. Gängige Bezeichnungen heute sind: Lichtschichtfluoreszenzmikroskopie und Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie, kurz LSFM und Lichtblattfluoreszenzmikroskopie (Light Sheet Fluorescence Microscopy LSFM) oder Single Plane Illumination Microscopy bzw. Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM). Schließlich wurde die Methode von Nature als „light-sheet fluorescence microscopy“ zur Methode des Jahres 2014 benannt [22].

Statt die gesamte Probe mit einem Kondensor wie in der Weitfeldmikroskopie zu beleuchten oder sie durch das Objektiv hindurch punktweise abzurastern, wie in der Konfokalmikroskopie, wird die Probe von der Seite mit einer möglichst gleichmäßig dünnen Schicht aus Licht beleuchtet (siehe Abbildung 2). Das von der Probe erzeugte Fluoreszenzlicht wird dann orthogonal zur Beleuchtungsebene wie in einem Weitfeldmikroskop scharf auf einen lichtempfindlichen Matrixdetektor abgebildet. So lassen sich optische Probenschnitte anfertigen (optical sectioning), die schließlich eine volle Volumenbildgebung ermöglichen. Ein Vorteil gegenüber der konfokalen Mikroskopie besteht in einer parallelisierten Bildgebung, die kürzere Messzeiten oder geringere Bestrahlungsstärken erlaubt. Außerdem werden Anregungslicht und damit verbunden Streulicht und die optische Zerstörung der Probe außerhalb des Fokus der Detektionsoptik weitgehend vermieden.

Durch die methodisch bedingte Trennung von Anregungs- und Detektionsoptik wird zusätzlich störende Streuung oder Fluoreszenz in den optischen Komponenten vermieden.

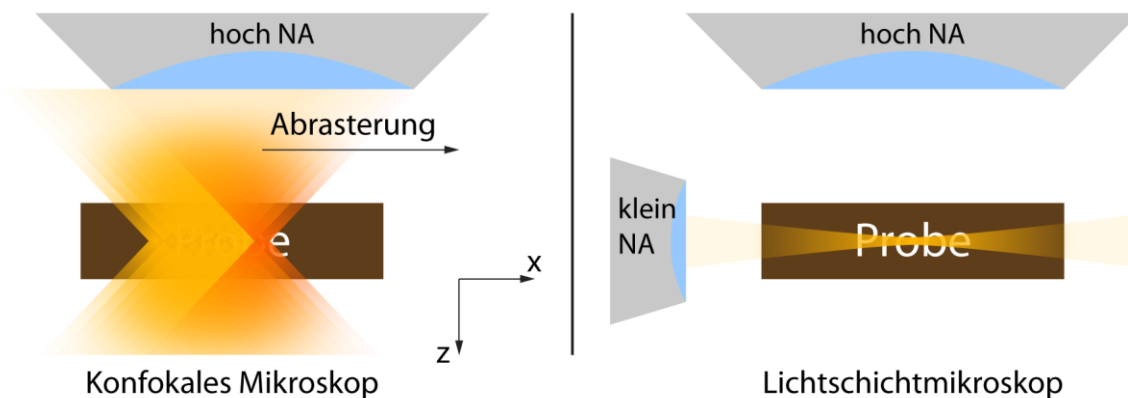


Abbildung 2: Vergleich der Beleuchtungsgeometrie von konfokalem Mikroskop und Lichtschichtmikroskop. Es ist zu erkennen, dass die Bestrahlungsenergie während des Bildgebungsprozesses nur bei der Lichtschichtbeleuchtung außerhalb des Fokus der hoch NA Detektionsoptik abnimmt.

Die Erfolge der Lichtschichtbeleuchtung sollten sich auf die Raman-Mikroskopie übertragen lassen. Erste erfolgreiche Versuche dazu gab es schon kurz vor Beginn dieser Arbeit [23], [24]. Jedoch ist es dabei noch nicht gelungen, gleichzeitig die volle Spektralinformation des Raman gestreuten Lichtes eines ganzen Bildes aufzunehmen. Dies ist insofern eine Herausforderung, als dass es keine Bilddetektoren gibt, die eine dreidimensionale Information aufzeichnen können. Die erfolgreiche Lösung dieses Problems durch ein dafür eigens entwickeltes bildgebendes Spektrometer wird im 2. Kapitel dieser Arbeit über „Entwicklung eines Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers“ beschrieben [25]. Eine zweite Lösung wurde zeitgleich zu dieser Arbeit in [26] vorgestellt.

Mit dem entwickelten Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometer konnte von einer Probe aus Polystyrol (PS) und Polymethylmethacrylat-Kugeln (PMMA) ein hyperspektrales Raman-Bild bestehend aus über 4 000 000 Spektren in 3,5 min mit einer spektralen Auflösung von 18 cm^{-1} bzw. in $< 14 \text{ min}$ mit $4,4 \text{ cm}^{-1}$ aufgezeichnet werden. Mit der Neuentwicklung war es ebenfalls möglich, ein räumliches Volumen aus 50 Ebenen eines Zebrafischembryos mit voller spektraler Information aufzuzeichnen ($1024 \times 1024 \times 50$ Spektren).

Am Ende des ersten Teils der Arbeit wird beim direkten Vergleich der Leistungsfähigkeit eines Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers mit der eines konfokalen Raman-Mikroskops klar werden, dass eine Bewertung dieser Techniken etwas mehr Sorgfalt erfordert, als es in [16] zunächst den Anschein hat.

Man wird sehen, dass sich die Gewinne, welche die Lichtschichttechnik bei der Fluoreszenzmikroskopie mit sich bringt, praktisch nicht im vollen Umfang auf die Raman-Mikrospektroskopie übertragen lassen.

Die Annahme, die auch schon linienweise abtastende Systeme als elegante Lösung erscheinen ließ, dass es eine feste, an eine Bestrahlungsstärke gebundene Zerstörschwelle der Probe gibt, wird sich als nicht haltbar erweisen. Vielmehr wird sich zeigen, dass der relevante Zerstörmechanismus für biologische Proben in der Raman-Mikrospektroskopie thermischer Natur ist. Somit sind weniger eine absolute Bestrahlungsstärke als der geometriebedingte Energieeintrag und die Energieabführung limitierend.

Diese Erkenntnis gibt Anlass genug, um sich im 3. Kapitel dieser Arbeit ausführlich über „Signal- und Geschwindigkeitsgrenzen in der Mikrospektroskopie“ Gedanken zu machen und die physikalischen Grenzen bei der praktischen Anwendung von spontaner Raman-Mikrospektroskopie zu finden. Dazu werden für verschiedene gängige Beleuchtungsgeometrien der Mikroskopie die Signalausbeuten und die thermischen Auswirkungen auf die Probe berechnet. Die Ergebnisse werden dann mit den Signal- und Rauscheigenschaften verschiedener Klassen von Spektrometern verbunden.

2. Entwicklung eines Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers

In diesem Teil der Arbeit wird die Kombination einer Lichtschichtbeleuchtung mit einem neu zu entwickelnden, bildgebenden Fourier-Transformations-Spektrometer beschrieben. Durch diesen Ansatz werden gleichzeitig alle Bildpunkte im Fokus eines Sichtfeldes beleuchtet und es wird für jeden die volle spektrale Information des Stokes gestreuten Raman-Lichtes gewonnen. Teile dieses Kapitels incl. gekennzeichnete Abbildungen wurden in einem Fachartikel auf Englisch publiziert [25] (<https://doi.org/10.1364/OPTICA.3.000452>).

Ausgangspunkt für den Aufbau eines Lichtschichtmikroskops war das offene Projekt zur Lichtschichtfluoreszenzmikroskopie (LSFM) OpenSPIM [27], [28]. Anders als bei vielen lichtmikroskopischen Techniken wird dort die Probe nicht auf einem gläsernen Objektträger gehalten und mit einem Deckgläschen geschützt. Stattdessen wird sie in einen kleinen Zylinder aus 1-2% Agarose eingebettet, welcher wiederum in eine wassergefüllte Kammer gehängt ist. So ist die Probe dreidimensional im Sichtfeld positionierbar und die eingetragene Wärmeenergie kann abgeführt werden.

2.1. Wahl der Komponenten

2.1.1. Die Mikroskopobjektive und deren Anordnung

Zur Erzeugung der Lichtschicht wird eine Optik mit niedriger numerischer Apertur (NA) und zur Detektion eine Optik mit hoher NA jeweils für Wasserimmersion eingesetzt. Beide werden waagrecht und orthogonal zueinander im Arbeitsabstand (Working Distance WD) zur Probe angeordnet. Generell eignen sich Wassertauchobjektive mit langem Arbeitsabstand wie sie für die Physiologie verwendet werden. Ein Objektivpaar, das sich konstruktionsbedingt (siehe Abbildung 3) für die Lichtschichtmikroskopie eignet und in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen ist, besteht aus:

Erzeugung der Lichtschicht: Nikon CFI Plan Fluor W 10×; NA: 0,30; WD: 3,50 mm

Detektion Raman: Nikon CFI Apochromat 40× W NIR; NA: 0,80; WD: 3,50 mm

Die Vergrößerungen beziehen sich dabei auf die zugehörige Tubuslinse von 200 mm Brennweite. Beide Objektive bilden die Probe farbkorrigiert ins Unendliche ab (Chrome Free Infinity CFI). Dies wird später für die Spektroskopie ausgenutzt. Die Probenkammer wurde in Anlehnung an das OpenSPIM Projekt konstruiert, jedoch auf die Nikon Objektive angepasst und für die Verwendung für das etwas robustere optische „cage system“ vorgesehen. Zur Positionierung der Probe kam die gleiche, beim OpenSPIM Projekt verwendete USB 4D-Bühne (XYZR) von Picard Industries zum Einsatz.

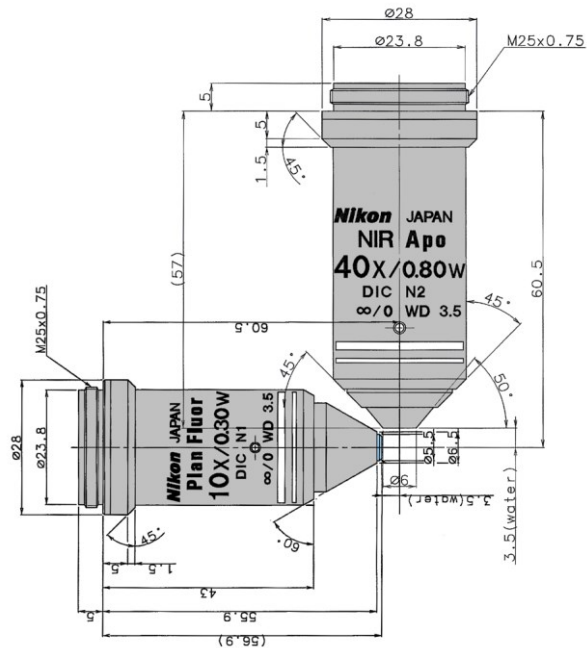


Abbildung 3: Kombination des Nikon CFI Plan Fluor W 10x; NA: 0,30 zur Beleuchtung und des Nikon CFI Apochromat 40x W NIR; NA: 0,80 zur Detektion. Die Konstruktionszeichnungen der beiden Objektivs sind aus dem jeweiligen Herstellerdatenblatt entnommen [29].

2.1.2. Der Laser

Zur Erzeugung der Lichtschicht werden für die LSFM häufig Dioden-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung um 100 mW eingesetzt. Die Wellenlänge muss hier zum Anregungsspektrum der verwendeten Fluorophore passen. Kurze Wellenlängen sind vorteilhaft für die Auflösung der Lichtschicht.

In der Raman-Mikroskopie haben Anregungslaser im nahen Infrarotbereich (typ. 785 nm) die Vorteile hoher Eindringtiefe (geringe Absorption von Wasser und Hämoglobin [30]) und der Vermeidung von Fluoreszenz. Dem gegenüber stehen jedoch die Nachteile eines geringen Raman-Streuquerschnittes, geringer Empfindlichkeit von Silizium-Detektoren für das Stokes gestreute Licht und einer wellenoptisch bedingten, geringen Auflösung. Eine Halbierung der Wellenlänge, z.B. 405 nm, führt zu einem 16-fach höheren Raman-Streuquerschnitt und zu einer Verdopplung der räumlichen Auflösung. Auf der anderen Seite sprechen eine höhere Absorption in biologischen Proben und die schädliche Wirkung auf lebende Organismen oft gegen eine UV-Anregung.

Für diese Arbeit stand der, optisch gepumpte Halbleiterlaser (Optically Pumped Semiconductor Laser OPSEL) Genesis CX577-2000 SLM von Coherent zur Verfügung, der sich mit seiner hohen Frequenz- und Leistungsstabilität und seiner einstellbaren Ausgangsleistung bis zu 2 W als geeignet für das Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometer erwies (Technische Daten siehe Anhang A2.). Mit seiner Nennwellenlänge von 577 nm ist er ein Kompromiss zwischen NIR- und UV-Anregung, führt jedoch zu störender Autofluoreszenz in der Probe.

Da die Wellenlänge eher für die STED-Mikroskopie [31] an GFP [32] gebräuchlich ist als für die Raman-Spektroskopie, musste bei der Wahl des Rayleigh-Filters auf das Standardfilter Chroma Langpass-Filter ET 590 LP mit einem relativ großen Abstand von 495 cm^{-1} zur Anregung zurückgegriffen werden. Die Dämpfung des Rayleigh gestreuten Lichtes ist besser als 10^6 (OD6).

2.1.3. Die Kamera

Für die Detektion des Fluoreszenzsignals werden in der LSM oft sCMOS Kameras eingesetzt. Diese, in der Regel monochromatischen Kameras, verfügen im Vergleich zu anderen Kameras über eine hohe Quanteneffizienz, geringes Ausleserauschen, geringen Dunkelstrom, hohe Dynamik und erreichen hohe Bildraten mit mehreren Millionen Pixeln. Abgesehen davon, dass eine hohe Bildrate bei dem geringen zu erwartenden Raman-Signal kaum nötig ist, sind all diese Eigenschaften auch für die Raman-Mikroskopie wünschenswert. Als Bilddetektor kam daher eine ORCA-Flash4.0 V2 Digital CMOS Kamera von Hamamatsu mit 2048×2048 Pixeln und 70% Quanteneffizienz zum Einsatz (technische Daten siehe Anhang A3.).

Aus den gegebenen technischen Daten der einzelnen Komponenten lässt sich die Optik für die Erzeugung der Lichtschicht dimensionieren.

2.2. Dimensionierung und Erzeugung der Lichtschicht

Während in der Weitfeldmikroskopie die gesamte Probe mit der Beleuchtung angeregt wird, soll in der Lichtschichtmikroskopie nur der Teil der Probe angeregt werden, der im Fokus der Detektionsoptik liegt. Je dünner diese Schicht aus Licht ist, desto höher wird die Auflösung in die Tiefe (z-Richtung). Aus wellenoptischen Gründen kann Licht aber nicht beliebig lang, beliebig eng geführt werden. Bei der Ausleuchtung ist somit ein Kompromiss zwischen Schichtdicke und Schichtdivergenz zu finden.

Eine einfache Lichtschichtbeleuchtung kann durch einen elliptischen Gauß-Strahl (siehe Anhang A4.) beschrieben werden. Dieser soll so dimensioniert werden, dass eine möglichst flache, homogene und effiziente Ausleuchtung des Sichtfeldes (Field Of View FOV) erfolgt. Dabei helfen zwei Kriterien:

1.) Entlang der Beleuchtungsrichtung (x-Richtung) wird oft die Rayleighlänge des Strahls x_{Rz} so eingestellt, dass sie mit dem halben Sichtfeld FOV_x in der gleichen Richtung übereinstimmt:

$$x_{Rz} \approx \frac{FOV_x}{2}. \quad (1)$$

Dadurch ist die Dicke (z-Richtung) der Lichtschicht bis auf einen Faktor $\sqrt{2}$ konstant. Eine kürzere Rayleighlänge hat eine schärfere Lichtschicht (Taille) in der Mitte, jedoch auch eine höhere Divergenz an den Rändern zur Folge.

2.) Orthogonal zur Beleuchtungsrichtung (y-Richtung) sollte die Strahl-Taille w_{0y} bis auf einen Parameter m mit dem Sichtfeld FOV_y in der gleichen Richtung übereinstimmen (siehe Abbildung 4):

$$m \cdot w_{0y} \approx FOV_y . \quad (2)$$

Der Parameter m bestimmt dabei das Verhältnis aus Effizienz und Homogenität der Ausleuchtung. Wenn $m = 1$, so fällt die Bestrahlungsstärke an den Rändern in y-Richtung auf $1/\sqrt{e}$ im Vergleich zur Mitte ab und es werden 68,3% der Laserleistung im Sichtfeld verwendet. Wenn $m = 2$, so fällt die Bestrahlungsstärke an den Rändern auf $1/e^2$ im Vergleich zur Mitte ab, jedoch werden 95,4% der Laserleistung im Sichtfeld verwendet. Für eine ausführliche Diskussion siehe auch [33].

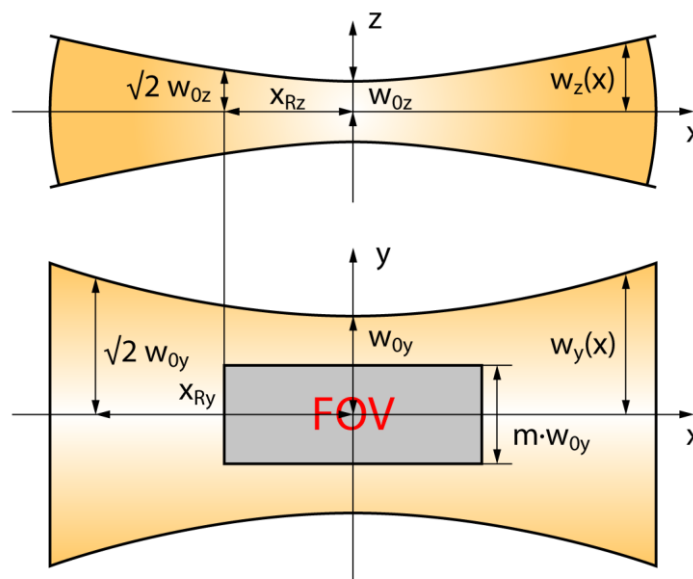


Abbildung 4: Beleuchtung des Sichtfeldes FOV in der Probe mit einem elliptischen Gauß-Strahl.

Mit dem ersten Kriterium kann der benötigte Radius $w_z(f)$ eines kollimierten Beleuchtungslaserstrahls für ein Beleuchtungsobjektiv mit der Brennweite f , der Wellenlänge im Immersionsmedium λ_W und einem Sichtfeld FOV_x (40x verkleinerter Kamerasensor in x-Richtung) berechnet werden:

$$w_z(f) = \sqrt{\frac{\lambda_W}{2\pi} FOV_x + \frac{\lambda_W}{\pi} \frac{2f^2}{FOV_x}} = 575 \mu m . \quad (3)$$

Um das Kriterium zu erfüllen, müsste der Laserstrahl mit dem Radius von 1,0 mm also um einen Faktor 1,7 verkleinert werden. Da sich dies im gleichen Maße negativ auf den Lichtschichtdurchmesser in der Mitte auswirken würde, wurde für diese Arbeit der Strahl direkt verwendet. Damit ist die z-Auflösung in der Mitte des Bildes besonders hoch.

Das zweite Kriterium bestimmt den benötigten Radius $w_y(f)$ in der Linsenebene eines in die rückwärtige Fokalebene fokussierten Beleuchtungslaserstrahls für ein Beleuchtungsobjektiv mit der Brennweite f und einem Sichtfeld FOV_y (40× verkleinerter Kamerachip in y-Richtung). Wie man leicht sieht, kann die Breite $w_y(f)$ der Lichtschicht rein Strahlenoptisch als kollimiertes Bündel berechnet werden:

$$w_y(f) = \sqrt{\left(\frac{FOV_y}{m}\right)^2 + \left(\frac{f\lambda_W}{\pi} \frac{m}{FOV_y}\right)^2} \approx \frac{FOV_y}{m}. \quad (4)$$

Tabelle 2: Übersicht über Eigenschaften der aufgebauten Lichtschichtbeleuchtung.

Eigenschaft	Symbol	Wert
Effektive Detektorfläche der Kamera	$d_c \cdot d_c$	13,312 mm × 13,312 mm
Pixelgröße der Kamera		6,5 μm × 6,5 μm
Pixelanzahl der Kamera	$M_x \cdot M_y$	2048 × 2048
Detektionsobjektiv (40×; 0,8 NA)	f_D	5 mm
Tubuslinse Brennweite	f_T	200 mm
Maximale laterale optische Auflösung (für 600 nm)		375 nm
Sichtfeld FOV (in der Probe)	$FOV_x \cdot FOV_y$	332,8 μm × 332,8 μm
Nominelle Pixelgröße in der Probe		162,5 nm × 162,5 nm
Brechungsindex (Wasser, bei 589 nm und 20° C) [34]	n	1,333
Laserwellenlänge in Luft	λ_l	576,8 nm
Laserwellenlänge in Wasser	$\lambda_W = \lambda_l/n$	432,7 nm
Beleuchtungsobjektiv (10×; 0,3 NA)	f_B	20 mm
Durchmesser des Laserstrahls in der hinteren Fokalebene des Beleuchtungsobjektivs	$w_z(f)$	2,1 mm
Radius der Strahltaile in z (Abfall auf $1/e^2$)	w_{0z}	2,6 μm
Durchmesser der Strahltaile in z (FWHM)		3,1 μm
Rayleighlänge des Strahls (bezüglich z)	x_{Rz}	50 μm
Durchmesser der am Rand des FOVs in z (FWHM)		10,5 μm
Zylinderlinse	f_Z	100 mm
Radius der Strahltaile in y (Abfall auf $1/e^2$)	w_{0y}	210 μm
Durchmesser der Strahltaile in y (FWHM)		247 μm
Bestrahlungsstärke am Rand (y-Richtung)		28,5% I_0
Laserleistung gesamt (typ.)	P_0	1 W
Wirkungsgrad der Beleuchtungsoptik (gemessen)	η	75%
Laserleistung in der Lichtschicht	$P_0 \cdot \eta$	750 mW
Bestrahlungsstärke in der Mitte der LS	I_0	0,867 mW μm ⁻²

Um das Kriterium zu erfüllen (für m zwischen 1 und 2), müsste der Laserstrahl mit dem Radius von 1,0 mm also um einen Faktor 3 bis 6 verkleinert werden. Hier wurde bei der Dimensionierung zu Gunsten der Bestrahlungsstärke der Faktor 5 festgelegt, der sich leicht mit einer Zylinderlinse mit Brennweite $f_Z = 100 \text{ mm}$ und dem Beleuchtungsobjektiv mit Brennweite $f_B = 20 \text{ mm}$ erreichen lässt. Die Schlüsselparameter der erzeugten Lichtschicht sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Der Gesamtaufbau zur Generierung der Lichtschicht umfasst zusätzlich zum Laser, der Zylinderlinse und dem Wassertauchobjektiv eine Lambda-Halbe-Platte zur Einstellung der Polarisationsrichtung und eine 4f-Relais-Optik mit zwei justierbaren Spiegeln (siehe Abbildung 5). Durch die Positionierung der Spiegel in die Brennweiten der Linsen, sind für die Lichtschicht getrennt voneinander die vier Justierungsfreiheitsgrade A - D verfügbar (siehe Tabelle 3). Mit den zusätzlichen Freiheitsgraden E und F der Objektivabstände lässt sich die Lichtschicht genau so einstellen, dass sie die Probe im Fokus der Detektionsoptik beleuchtet und dabei die Arbeitsabstände der Objektive eingehalten werden (siehe auch [35]). Da die Lichtschicht auf beide Spiegel als dünne Linie abgebildet wird, kommen hochreflektive und breitbandige dielektrische Spiegel mit 99,5% Reflektivität (bei 575 nm) zum Einsatz.

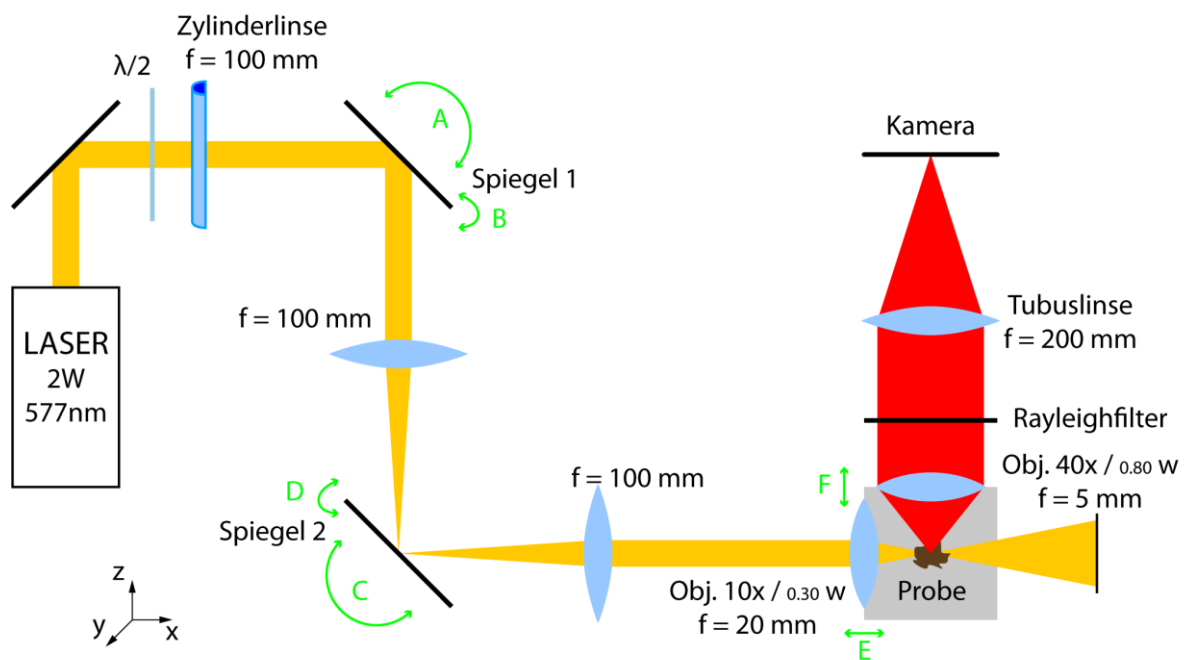
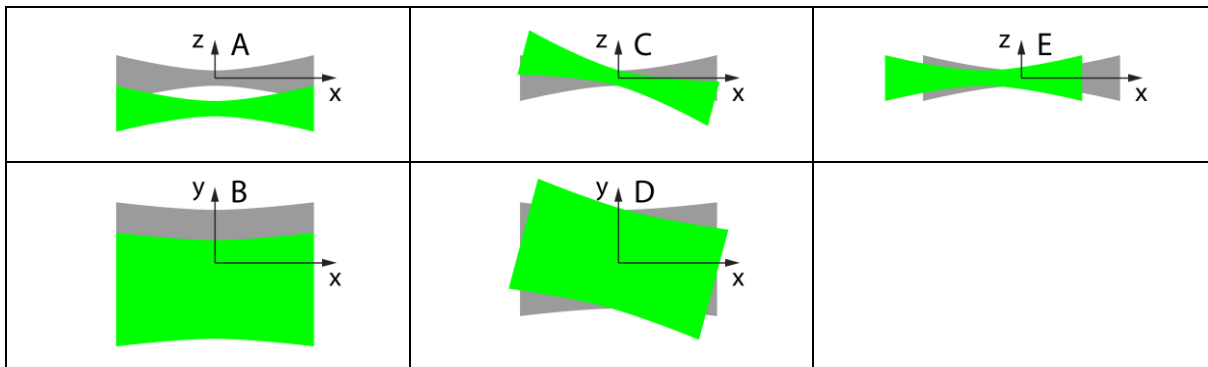


Abbildung 5: Aufbau zur Generierung der Lichtschicht. gelb: Strahlenverlauf der Beleuchtung über eine Lambda-Halbe-Platte, eine Zylinderlinse, eine 4f-Relais-Optik mit zwei justierbaren Spiegeln und ein Wassertauchobjektiv (10x; 0,3 NA); rot: Strahlenverlauf für eine einfache, breitbandige Detektion mit einem zweiten Wassertauchobjektiv (40x; 0,8 NA).

Auf diese Weise entsteht zusammen mit der Kamera, einer Tubuslinse mit Brennweite $f_T = 200 \text{ mm}$, dem Rayleigh-Filter und dem Detektionsobjektiv mit Brennweite $f_D = 5 \text{ mm}$ ein einfaches, breitbandiges Lichtschicht Raman-Mikroskop ohne spektrale Auflösung.

Tabelle 3: Justierfreiheitsgerade der Lichtschicht (grün) in der Probe. Die Großbuchstaben korrespondieren mit der Abbildung des Aufbaus.



2.3. Das bildgebende Fourier-Transformations-Spektrometer

Der chemische Kontrast einer Probe kann mit Hilfe von Raman-Streuung nur durch eine hochauflösende spektrale Lichtanalyse gewonnen werden. Ziel muss es dabei sein, möglichst effizient mit den geringen Mengen des in der Probe gestreuten Licht zu verfahren. Ein Ansatz, der das gesamte Streulicht, das von der Detektionsoptik gesammelt wird, zur spektralen Analyse nutzen kann, ist die Fourier-Transformations-Spektroskopie (FTS). Das Verfahren basiert auf der Auswertung eines Interferogramms einer Zweistrahlinterferenz. Aufgrund der guten Rauscheigenschaften bezüglich signalunabhängigen Rauschens kommt es häufig in der Infrarotspektroskopie zum Einsatz [36].

Die Zweistrahlinterferenz kann mit einem Michelson-Interferometer erzeugt werden, von dem ein Spiegel zur Einstellung der optischen Pfadlängendifferenz (OPD) variabel positioniert werden kann. Durch wiederholte Messungen mit unterschiedlichen OPDs wird das Licht im Interferometer autokorreliert und es entsteht ein Interferogramm, das unter Ausnutzung des Wiener-Chintschin-Theorems durch Fourier-Transformation in ein Leistungsdichtespektrum umgerechnet werden kann.

In dieser Arbeit wird ausgenutzt, dass sich eine Zweistrahlinterferenz nicht nur mit einem Strahlenbündel erreichen lässt, sondern auch gleichzeitig mit einem ganzen Bildfeld. Dazu wird das Objekt in das Unendliche abgebildet und zur Selbstinterferenz gebracht um anschließend scharf auf einen Detektor abgebildet zu werden. Eben ein solcher Unendlich-Strahlengang, in dem die Positionsinformation nur noch als Winkel codiert ist, existiert zwischen Objektiv und Tubuslinse von modernen Mikroskop-Optiken (siehe Abbildung 6). Je nach Hersteller existieren unterschiedliche Bezeichnungen für diese Technologie z.B.: Nikon: CFI (Chrome Free Infinity), Zeiss: ICS (Infinity Color Corrected System), auch: UIS (Universal Infinity System). Für die Interferometrie ist dabei wichtig, dass auch alle Farbkorrekturen bereits im Objektiv geschehen.

Dies ist für die in dieser Arbeit verwendeten Objektive von Nikon der Fall. Ein bildgebendes Interferometer kann demnach direkt in den Strahlengang der Mikroskop-Optik eingesetzt werden.

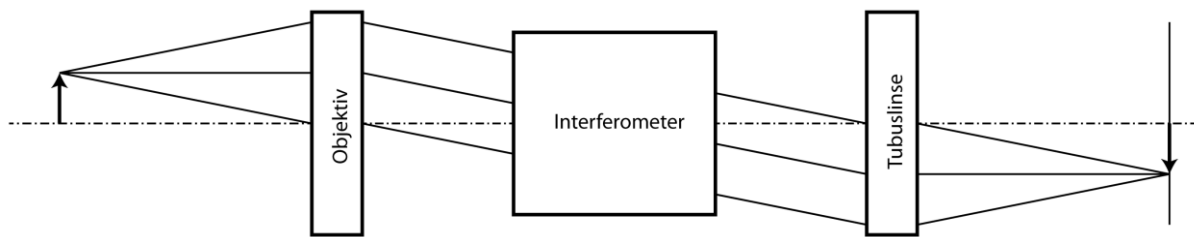


Abbildung 6: Telezentrisches 4f-Abbildungssystem mit Interferometer im Unendlich-Strahlengang.

Eine Herausforderung bei der Konstruktion eines beweglichen Interferometers ist die mechanische Stabilität. In vielen Konstruktionen wird dazu auf geschickt gefaltete Strahlengänge zurückgegriffen, die äußere mechanische Erschütterungen intrinsisch kompensieren [36]. Ein prominentes Beispiel, welches aufgrund seiner Robustheit oft in kommerziellen Systemen [37] für die hyperspektrale Bildgebung genutzt wird, ist das Sagnac-Interferometer [38]. Dabei ist die maximal erreichbare spektrale Auflösung gerade für große Sichtfelder im Vergleich zu Michelson-Interferometern sehr gering [39], [40]. Insgesamt führen lange Wege im Interferometer zu geringen Akzeptanzwinkeln, was den maximalen optischen Informationsdurchsatz, also den Lichtleitwert bzw. die Étendue und damit verbunden das Bildfeld schmälert.

Dies gab Anlass, im Rahmen dieser Arbeit einen neuen Interferometer-Typen zu entwickeln, welcher nicht nur eine hohe spektrale Auflösung bei gleichzeitig großem Sichtfeld ermöglicht, sondern auch gegen die meisten Freiheitsgrade der Bewegung intrinsisch stabil ist und wie ein Mach-Zehnder-Interferometer zwei Eingänge und zwei Ausgänge besitzt (Patent DE 10 2014 011 668 A1 [41]). Der verbleibende Freiheitsgrad, der notwendig ist zur Einstellung der optischen Weglänge, wird mit Hilfe eines 543 nm Helium-Neon-Lasers durch eine elektronische Regelschleife stabilisiert.

2.3.1. Aufbau des Interferometers

In dieser Arbeit wurde das Interferometer aus zwei nichtpolarisierenden Strahlteilerwürfeln und zwei reduzierten Retroreflektoren aufgebaut (siehe Abbildung 7). Das Interferometer besitzt somit vier getrennte Interferometer-Zugänge, die wahlweise als Ein- und Ausgänge für optische Strahlung genutzt werden können. Als Strahlteiler kamen zwei nicht polarisierende, 1:1 Teilerwürfel mit 35 mm Kantenlänge, dielektrischer Beschichtung, 45% Transmission und VIS Antireflexbeschichtung aus N-BK7 von Edmund zum Einsatz. Bei den Retroreflektoren handelte es sich um silberbeschichtete 76,2 mm Tripelspiegel aus N-BK7 mit VIS Antireflexbeschichtung von Edmund.

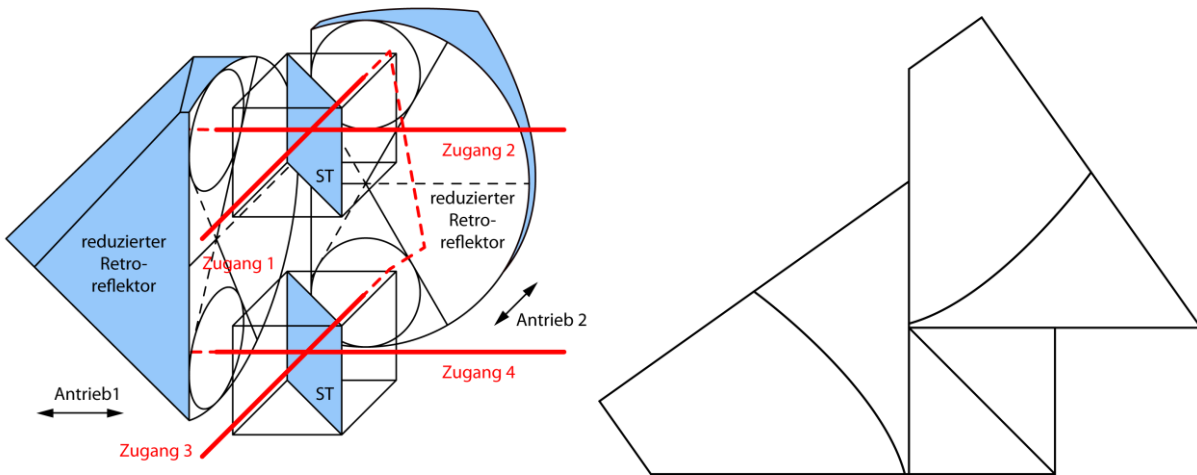


Abbildung 7: Stabiles Interferometer bestehend aus zwei konstruktiv reduzierten Retroreflektoren und zwei Strahlteilerwürfeln ST (links: perspektivische Ansicht (modifiziert nach [25]), rechts: Draufsicht enger Anordnung).

Tripelspiegel sind symmetrische Spiegelanordnungen, bestehend aus jeweils drei paarweise orthogonal angeordneten, planen und spiegelnden Flächen (Abbildung 8: Sektoren begrenzt durch durchgezogene Radien). Durch diese Anordnung besitzt ein Tripelspiegel sechs Sektoren (Abbildung 8: durchgezogene und gestrichelte Radien), welche die Eigenschaft haben, einfallendes Licht weitgehend unabhängig vom Einfallswinkel, parallel, mit einem Versatz durch den gegenüberliegenden Sektor, zu reflektieren. Die sechs Sektoren korrespondieren mit sechs qualitativ verschiedenen Reflexionspfaden mit eigenen Eigenschaften bezüglich der Übertragung der Polarisation. Sie unterscheiden sich auch in der Reihenfolge, mit der Lichtstrahlen die drei reflektierenden Flächen berühren.

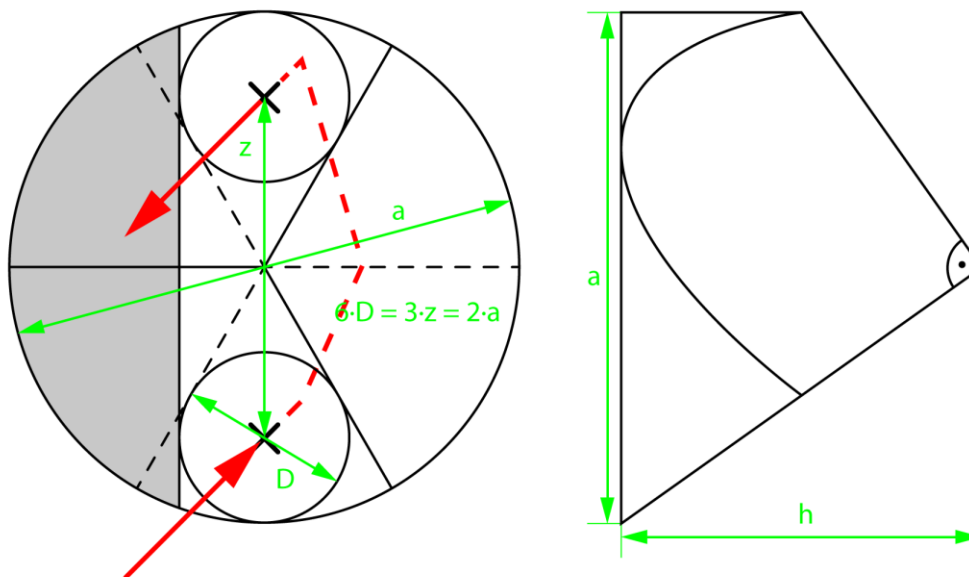


Abbildung 8: rechts: Frontansicht eines Retroreflektors mit Darstellung der sechs Sektoren und der Bereiche, die im Interferometer für optische Strahlung verwendet werden. Der graue Bereich wird nicht für die Retroreflexion benötigt und kann daher abgeschnitten werden. links: Seitenansicht

In diesem Interferometer wird von jedem Tripelspiegel nur jeweils einer der sechs möglichen Reflexionspfade benutzt. Dabei tritt das Licht jeweils in einem Eingangssektor in den Tripelspiegel ein, durchläuft einen ausgewählten Reflexionspfad und tritt anschließend aus einem Ausgangssektor aus (Abbildung 8). Soll nur ein Reflexionspfad eines Tripelspiegels benutzt werden, so ist der maximale Durchmesser D eines parallelen, kreisförmigen Strahlenbündels halb so groß wie der Abstand z der Zentren von Eingangs- und Ausgangsstrahlenbündel des Tripelspiegels. Um divergente Strahlung zu reflektieren, kann sich so der maximale Durchmesser der Apertur für Eingangs- oder Ausgangsstrahlenbündel auf der Frontfläche entsprechend verringern.

Da nicht die volle Apertur der Retroreflektoren genutzt wird, dürfen sie ohne Funktionsverlust um Teile konstruktiv reduziert werden, die nicht Bestandteil des verwendeten Reflexionspfades sind (Abbildung 8). Durch die Reduktion der Retroreflektoren lassen sich diese besonders nahe an den Strahlteilern positionieren (Abbildung 7: rechts), wodurch optische Weglängen signifikant reduziert werden (hier um knapp 5 cm).

2.3.2. Mechanische Eigenschaften des Interferometers

Wird das Interferometer in den Unendlich-Strahlengang einer Abbildungsoptik integriert, ist es gegen alle Freiheitsgrade der mechanischen Veränderung innerhalb des Interferometers so gut stabilisiert, dass auch über lange Zeiträume Interferenzen vermessen werden können. In der Raman-Spektroskopie bzw. Raman-Bildgebung, bei der nur sehr wenig Streulicht zur Verfügung steht, ist das für lange Belichtungszeiten besonders wichtig. Im Folgenden sind die Schlüsseleigenschaften des Interferometers aufgezählt:

1. Die Retroreflektoren des Interferometers sind kippinvariant.
2. Die beobachtete Interferenz ist in der Detektorebene weitgehend invariant gegen Verschieben der Retroreflektoren entlang ihrer Frontflächen, da sich diese im Unendlich-Strahlengang einer Abbildungsoptik befinden.
3. Der verbleibende Freiheitsgrad der Retroreflektoren, der die optische Weglängendifferenz im Interferometer beeinflusst, wird durch eine Regelungseinrichtung anhand eines Referenzlasers stabilisiert.
4. Trotz aller Einrichtungen und genutzter Symmetrien zur stabilen Interferenz sind die optischen Pfadlängen zwischen den beiden Strahlteilern sehr kurz, was zu hohen Akzeptanzwinkeln von Strahlung und somit zu einem hohen Lichtleitwert (Étendue) führt.
5. Durch eine bauliche Vereinigung der beiden Strahlteiler wird in Kombination mit den Retroreflektoren eine Feinjustierung unnötig.

2.3.3. Optische Eigenschaften des Interferometers

1. Die Verwendung nur eines Reflektionspfades vermeidet das Vermischen der Polarisationsseigenschaften von mehreren Sektoren. Im Fall von divergenter Strahlung würde das Benutzen von mehreren Sektoren zusätzlich zu einer Veränderung der Mischungsverhältnisse der Polarisationsseigenschaften in Abhängigkeit von den Retroreflektorpositionen führen, was die Signalqualität verschlechtern und die Rekonstruktion der Spektralinformation erschweren würde.
2. Das Interferometer besitzt, wie ein Mach-Zehnder-Interferometer, vier getrennte Zugänge, die sich als Ein- und Ausgänge benutzen lassen.
3. Der typische Interferenzkontrast, der mit diesem Interferometer Aufbau erreicht wurde, lag bei 92% (Maximum minus Minimum durch Summe beider Ausgänge).

2.3.4. Allgemeine geometrische Eigenschaften des Interferometers

Der Lichtleitwert (Étendue) des Interferometers ist allgemein durch die Aperturgröße und den Akzeptanzwinkel für Lichtstrahlung gegeben. Der maximale Akzeptanzwinkel ist dabei selbst von Aperturgröße und -position abhängig. Wo die Apertur wirksam wird, hängt von der Dimensionierung der Abbildungsoptik ab. Als Maß zur Vergleichbarkeit mit anderen Interferometern kann der maximale Akzeptanzwinkel für eine dünne parallele Strahlung verwendet werden.

Der Durchmesser a eines symmetrischen, nicht reduzierten Tripelspiegels mit kreisförmiger Frontfläche ist in Abbildung 8 gegeben. Der Abstand zwischen dem Schnittpunkt der drei paarweise orthogonalen Spiegelflächen und der Frontfläche des Tripelspiegels heißt Höhe h . Sie steht senkrecht auf der Frontfläche. Für einen Tripelspiegel, bei dem sich die drei paarweise orthogonalen Spiegelflächen in je einem Punkt mit der kreisförmigen Frontfläche schneiden, gilt für die Höhe:

$$h = a\sqrt{0,5} . \quad (5)$$

Die Weglänge eines von allen drei Spiegelflächen reflektierten achsenparallelen Strahles beträgt genau das Doppelte der Höhe des Tripelspiegels $2h$. Soll nur ein Reflexionspfad eines Tripelspiegels benutzt werden, so ist der maximale Durchmesser D eines parallelen, kreisförmigen Strahlenbündels halb so groß wie der Abstand z der Zentren von Eingangs- und Ausgangs-Strahlenbündel des Tripelspiegels bzw. ein Drittel so groß wie der Durchmesser a der Frontfläche (siehe Abbildung 8). Vereinfacht lässt sich der Tripelspiegel somit aufgefalteter als ein Zylinder des Durchmessers $a/3$ und der Länge $a\sqrt{2}$ betrachten.

Begrenzt durch den Tripelspiegel (siehe Abbildung 9) ergeben sich die maximalen Akzeptanzwinkelbereiche im Medium α und in Luft β . (N-BK7: $n = 1,515$ bei $632,8 \text{ nm}$ [42], [43])

$$\alpha = \pm \tan^{-1} \frac{\sqrt{2}}{6} \approx \pm 13,2^\circ, \quad \beta = \pm \sin^{-1} \left(\frac{n}{\sqrt{19}} \right) \approx \pm 20,35^\circ. \quad (6)$$

Für nicht zylindersymmetrische Strahlenbündel lässt sich ein noch größerer Teil der Tripelspiegel benutzen (z.B. für einen zusätzlichen Referenzlaser).

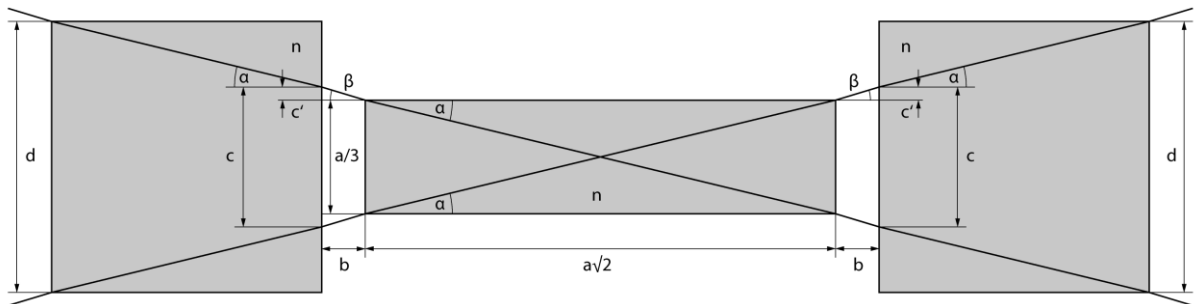


Abbildung 9: Aufgefaltete Darstellung des Interferometers in einem der beiden Interferometerarme. v.l.n.r.: erster Strahlteilerwürfel mit Brechungsindex n , Lücke mit Brechungsindex 1, aufgefalteter Tripelspiegel als Glaszylinder mit Brechungsindex n , Lücke mit Brechungsindex 1, zweiter Strahlteilerwürfel mit Brechungsindex n .

In einem Michelson-Interferometer entfällt der Tripelspiegel mit der Länge $a\sqrt{2}$. Der maximale Akzeptanzwinkel im Medium α_M und in Luft β_M wird unter Vernachlässigung der Abstände b somit durch die Würfelform der Strahlteiler begrenzt:

$$\alpha_M = \pm \tan^{-1} \frac{1}{2} \approx \pm 26,56^\circ, \quad \beta_M = \pm \sin^{-1} \left(\frac{n}{\sqrt{5}} \right) \approx \pm 42,69^\circ. \quad (7)$$

Im Interferometer mit Tripelspiegeln geben die Tripelspiegel die benötigte Kantenlänge der Strahlteilerwürfel vor. Für einen Durchmesser des Tripelspiegels a , einen Abstand b , einen Brechungsindex der optischen Komponenten n und den maximalen Akzeptanzwinkel α ergibt sich eine minimale Kantenlänge d für einen Strahlteilerwürfel (siehe Abbildung 9):

$$d = \frac{\frac{a}{3} + 2c'}{1 - 2 \tan \alpha} = \frac{\frac{a}{3} + 2b \frac{n}{\sqrt{19 - n^2}}}{1 - \frac{\sqrt{2}}{3}}. \quad (8)$$

Für den verwendeten 3" Tripelspiegel aus N-BK7 ergeben sich für zwei verschiedene Abstände b und b' folgende Kantenlängen d und d' :

$$\begin{aligned} a &= 3'' = 7,62 \text{ cm}, & a &= 3'' = 7,62 \text{ cm}, \\ b &= 0 \text{ cm}, & b' &= 1 \text{ cm}, \\ d &= 4,81 \text{ cm}, & d' &= 6,2 \text{ cm}. \end{aligned}$$

Für ein auf Apertur A ausgedehntes Strahlenbündel reduziert sich der Akzeptanzwinkel α des Interferometers (siehe Abbildung 10). Die Strahlteiler können entsprechend eine geringere Kantenlänge d aufweisen. Für die Anwendung des Interferometers in dieser Arbeit genügen Strahlteilerwürfel mit 35 mm Kantenlänge.

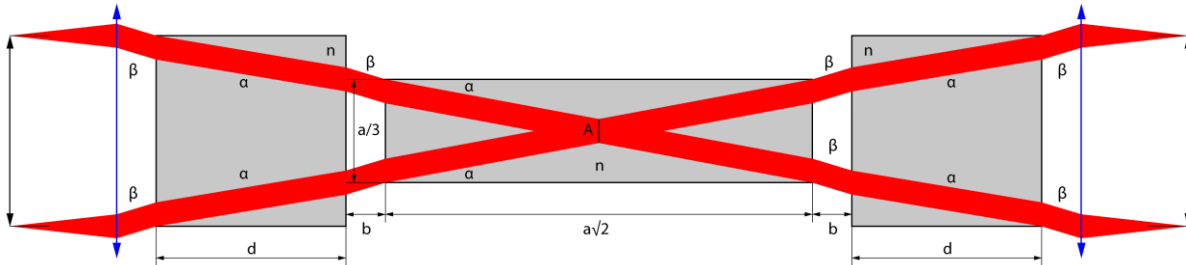


Abbildung 10: Aufgefaltete Darstellung eines Armes des Interferometers mit einem um A ausgedehnten Strahlenbündel und zusätzlichen 1:∞ Abbildungsoptiken (blau). Die Apertur A befindet sich in der Mitte des Retroreflektors (entlang der optischen Achse). (modifiziert nach [25])

Um den vignettierungsfreien Akzeptanzwinkel des Interferometers zu steigern ist es günstig, möglichst viel des von Strahlung durchlaufenen Raumes des Interferometers mit stark brechendem Material auszufüllen. Prinzipiell kann der Akzeptanzwinkel und damit der Lichtleitwert durch kurze Wege und durch hoch refraktive Materialien erhöht werden.

2.3.5. Geometrische Eigenschaften des Interferometers im Mikroskop

Im Mikroskopieaufbau dieser Arbeit wurde das Interferometer direkt in den Strahlengang der Detektionsoptik zwischen Objektiv und Tubuslinse integriert. Die Apertur des Systems ist daher die hintere Fokalebene des Mikroskopieobjektivs und liegt somit am Anfang der Interferometerarme. Der Divergenzwinkel der Strahlung im Mikroskop für die Diagonale des Kameradetektors $\sqrt{2} \cdot d_c$ beträgt im Medium α und in Luft β :

$$\alpha = \pm \sin^{-1} \left(\frac{1}{n} \frac{\sqrt{2} \cdot d_c}{2f_T} \right) \approx \pm 1,78^\circ, \quad \beta = \pm \sin^{-1} \left(\frac{\sqrt{2} \cdot d_c}{2f_T} \right) \approx \pm 2,70^\circ. \quad (9)$$

Zusammen mit dem Abstand zwischen Mikroskopobjektiv und Tubuslinse von 220 mm ± 10 mm, einer hinteren Fokalebene von 8 mm Durchmesser und dem Winkel α (nicht β , da der optische Strahlengang hauptsächlich mit Glas gefüllt ist) ergibt sich an der Tubuslinse eine ausgeleuchtete Fläche mit einem Durchmesser etwas über 22 mm. Im Vergleich dazu hat die Tubuslinse selbst einen Durchmesser von 30 mm. Das System ist mit dem Interferometer also so dimensioniert, dass keine Vignettierung (Randabschattung) auftritt. Durch eine zentralere Lage der Apertur in den Interferometerarmen ließen sich der Akzeptanzwinkelbereich und damit die Größe des maximalen Sichtfeldes weiter steigern. Dazu wäre jedoch eine zusätzliche oder andere Abbildungsoptik, in die das Interferometer eingebettet ist, notwendig.

2.3.6. Aktive Stabilisierung der optischen Pfaddifferenz (OPD)

Einer der beiden Retroreflektoren ist auf einer piezomotorisierten Bühne vom Typ LPS-45 von PI miCos frei positionierbar angebracht. So können durch absolute Positionskommandos Interferogramme für die Fourier-Transformations-Spektroskopie abgetastet werden. Die motorisierte Bühne besitzt selbst einen optischen Positionsenkoder, der jedoch absolut gesehen fern von der im Datenblatt gegebenen Nanometerpositioniergenauigkeit liegt. Daher wird die OPD im Interferometer zusätzlich dynamisch mit Hilfe einer aktiven digitalen Regelschleife korrigiert. Zur Positionsbestimmung wird ein 0,5 mW Helium-Neon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 543 nm und einer Kohärenzlänge von ca. 30 cm parallel zum Raman gestreuten Licht geführt und zur Interferenz gebracht. Die entstehende Interferenzinformation wird an beiden Ausgängen des Interferometers mit je einer Photodiode vom Typ BPW 34 von OSRAM, einem Operationsverstärker vom Typ TL 072 und einem 10 Bit onchip Analog-Digital-Wandler eines ATmega2560 8 Bit Mikrokontroller von Atmel vermessen.

Der Regler ist dabei auf dem ATmega2560 8 Bit Mikrokontroller eines Arduino MEGA 2560 [44] als eine in C geschriebene Firmware implementiert, welche im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Mit diesem Mikrokontroller werden die Interferenzinformationen mit 32 Bit Gleitkomma in Echtzeit verarbeitet und als Stellgröße in Form von absoluten Positionskommandos über eine RS232 Schnittstelle an die Steuerung (E-871 PIShift Controller) der piezomotorisierten Bühne weitergegeben (siehe Abbildung 11). Die notwendige elektrische Levelanpassung von UART (0-5V TTL) auf RS232 übernimmt dabei ein MAX232AEPE Schaltkreis von Maxim.

Bei jedem Start der Firmware wird das Eingangssignal des Reglers für verschiedene Spiegelpositionen kalibriert, um Unterschiede in Helligkeit und Hintergrund der Referenzstrahlung in beiden Interferometerarmen algorithmisch durch Normalisierung auszugleichen. Während der Messung eines ganzen hyperspektralen Bildes sorgt die Firmware dafür, dass wiederholt neue OPDs eingestellt und diese während der einzelnen Interferenzmustersaufnahme stabil gehalten werden. Für das reibungsfreie Zusammenspiel in der Regelschleife tauschen die verwendete sCMOS-Kamera und die Motorsteuerung jeweils elektrische Triggersignale mit dem Arduino-Steuerrechner aus.

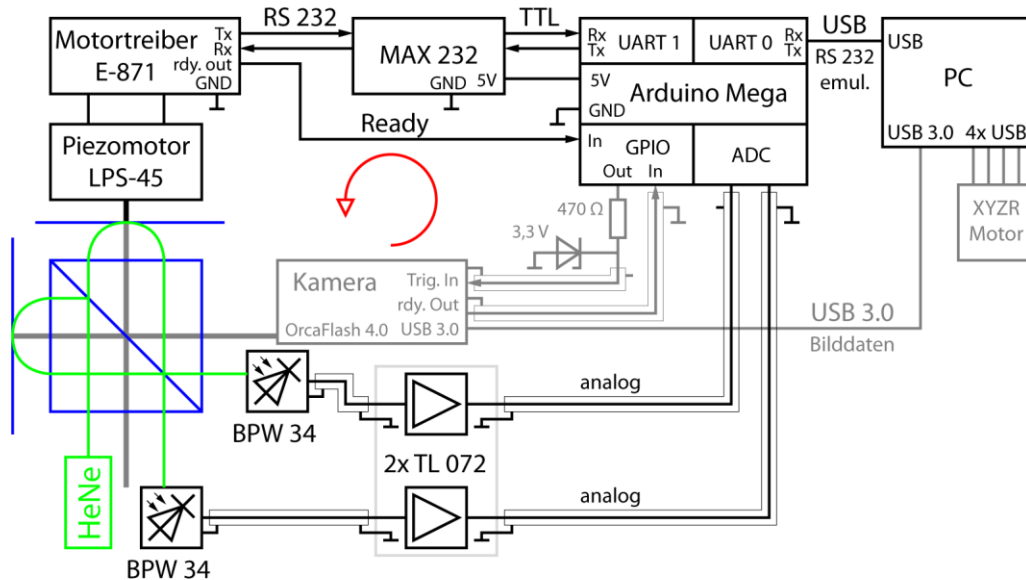


Abbildung 11: Regelschleife für die aktive Stabilisierung der optischen Weglänge im Interferometer: Interferometer (blau), Referenzlaser (grün), Komponenten der Regelschleife (schwarz), Richtung der Regelschleife (rot), Kamera und Motor für die Probenpositionierung (grau).

Die erreichbare Stabilität der OPD hängt dabei von der Fähigkeit die tatsächliche Reflektorposition zu bestimmen und der Reaktionsfähigkeit der Regelschleife ab. Für die Positionierung des Reflektors werden später im Experiment ausschließlich die Wendepunkte der Interferenz verwendet (gleiche Leistung in beiden Interferometerarmen). Sie genügen aufgrund der etwas kürzen Referenzwellenlänge (543 nm) im Vergleich zum Raman gestreuten Licht (< 577 nm) für eine Abtastung entsprechend dem Nyquistkriterium. Zusätzlich sind sie durch eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber kleinen Positionsfehlern ausgezeichnet. Für andere Anwendungen ließe sich durch die Verwendung eines vollen Quadratsignals eine positionsunabhängige Positionierempfindlichkeit erreichen [45].

Die Messgenauigkeit der Reflektorposition lässt sich wiederum aus dem SNR der Referenzinterferenz ableiten. Dieses SNR wird durch das Poissonverteilte Schrotrauschen an den Photodioden, das Dunkelstromrauschen der Photodioden und das Rauschen der Verstärker und AD-Wandler bestimmt. Das Schrotrauschen kann dabei anhand der Anzahl der Photoelektronen einer Positionsmessung abgeschätzt werden. Die Signalparameter des Referenzinterferometers sind dabei gegeben durch:

P	Laserleistung:	$0,5 \text{ mW}$,
λ	Wellenlänge:	543 nm ,
τ	Belichtungszeit:	$100 \mu\text{s}$ (Zeitkonstante der AD-Wandler),
η	Effizienz der Photodioden:	$0,90 \text{ e}^-/h\nu$ (bei 850 nm, aus Herstellerdatenblatt).

Die Anzahl der erzeugten Photoelektronen im Zeitraum τ ergibt sich als Signal S damit zu:

$$S = \eta P \tau \frac{\lambda}{hc} = 123 \cdot 10^9 . \quad (10)$$

Das SNR des Photostroms ergibt sich aufgrund der Poissonverteilung des Schrotrauschens:

$$SNR_S = \frac{S}{N} = \frac{S}{\sqrt{S}} = \sqrt{S} = 350\,000 . \quad (11)$$

Das SNR eines $N = 10$ Bit AD-Wandlers liegt bei halber Aussteuerung durch Quantisierungsrauschen theoretisch bei:

$$SNR_{AD} = \frac{S}{N} = \frac{0,5}{\sqrt{12}^{-1} 2^{-N}} = 1774 . \quad (12)$$

Der Faktor $\sqrt{12}^{-1}$ ergibt sich dabei aus der Berechnung der Varianz des gleichverteilten Quantisierungsrauschens um $\pm \frac{1}{2}$ Quantisierungsschritt.

Im Experiment zeigte die Elektronik ein zusätzliches Rauschen mit einer Standardabweichung von ± 1 Quantisierungsschritt. Dieses Rauschen bestimmt somit das Gesamt-SNR der Helligkeitsmessung zu:

$$SNR_G = \frac{0,5}{2 \cdot 2^{-N}} = 256 . \quad (13)$$

Durch Fehlerfortpflanzung lässt sich aus diesem Wert die Standardabweichung bei der Bestimmung der Position in den Wendepunkten der Interferenz berechnen. Das Interferenzsignal an einer Photodiode ist dabei gegeben durch:

$$S = \frac{1 + \sin\left(2\pi \frac{OPD}{\lambda}\right)}{2} . \quad (14)$$

Daraus ergibt sich für die optischen Pfadlängendifferenz:

$$OPD = \frac{\lambda}{2\pi} \sin^{-1}(2S - 1) . \quad (15)$$

Die Fehlerfortpflanzung ergibt für das abgegliche Interferometer (Wendepunkte: $S = 0,5$) als Standardabweichung:

$$\Delta OPD = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{1 - S^2}} \Delta S = \frac{\lambda}{\pi\sqrt{3}} \Delta S = \frac{543 \text{ nm}}{\pi\sqrt{3}} \frac{1}{256} = 0,4 \text{ nm} . \quad (16)$$

Mit Hilfe des Referenzlasers kann die OPD demnach mit einer Standardabweichung von 0,4 nm bestimmt werden. Das Signal der Regelschleife kann nach den Operationsverstärkern direkt mit einem Oszillographen vermessen werden.

Die Nullstellen der interferierenden Referenzstrahlung können mit dem Piezomotor breitbandig (100 Hz) mit besser als 5 nm mechanisch stabil gehalten werden. Die mittlere Positionierung um eine einzelne Nullstelle (schmalbandige Messung der Position) kann deutlich präziser ausfallen. Es ist demnach möglich, mit dem aktiv stabilisierten Interferometer ein Interferogramm präzise, kammförmig abzutasten, wobei die Zinken des Kamms schmaler als 5 nm ausfallen. Die absolute Position hängt dabei im Wesentlichen von der Wellenlängenstabilität des Referenzlasers ab.

2.3.7. Abtastung der Streulichtinterferogramme

Die Interferenzmuster Raman gestreuten Lichts werden an einem Ausgang des Interferometers mit der sCMOS Kamera aufgezeichnet. Dazu wird die OPD des Interferometers zwischen zwei Bildern in gleichmäßigen Schritten verändert. Die Schrittgröße ist dabei durch ganzzahlige Vielfache des Nullstellenabstandes der Referenzstrahlung von 271,5 nm gegeben.

Da das Raman-Signal stark bandbreitenbegrenzt ist, lassen sich ohne Informationsverlust durch absichtliches Unterabtasten Einzelbilder von Interferenzen sparen. Durch die deltakammartige Abtastung der Interferenz entfällt der Tiefpassfiltereffekt, den breite Abtastschritte mit sich bringen würden. Durch OPD-Schritte von 543 nm wird das gesamte Lichtspektrum an der Nyquistfrequenz einfach gespiegelt (siehe Abbildung 12). Zu rekonstruieren verbleibt demnach nur noch das Band zwischen 1086 nm und 543 nm (8123 cm^{-1} bis -1085 cm^{-1} bezogen auf die Anregung von 577 nm). Dieser auch als Aliasing bekannte Effekt führt hier zur Halbierung der Datenmenge und zur Halbierung der nötigen Schritte zur Neupositionierung des Strahlenteilers.

Für eine leichtere Auswertung und anschließende Phasenkorrektur werden stets volle doppelseitige Interferogramme aufgezeichnet. Diese haben zusätzlich positive Rauscheigenschaften [36].

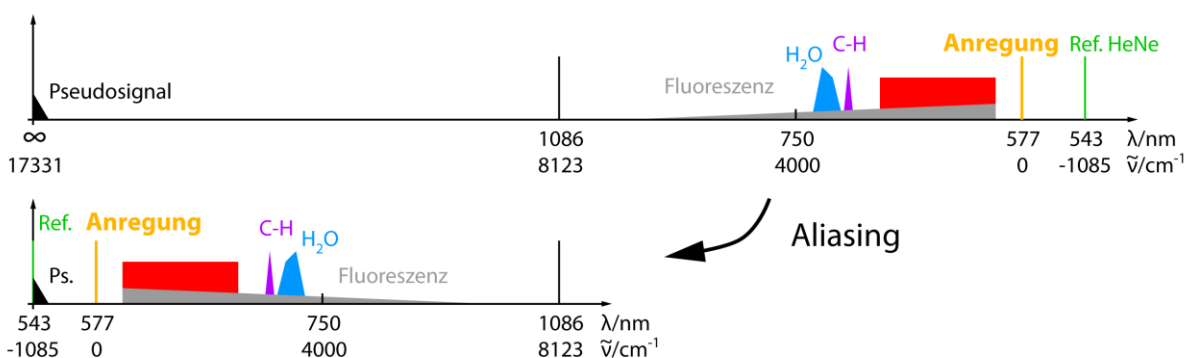


Abbildung 12: Einfache Unterabtastung der Interferenz am Ausgang des Interferometers mit typischen Raman- und Fluoreszenzsignalen. Das Pseudosignal (Ps.) nahe der Nullfrequenz entsteht durch langsame, zeitliche Veränderungen in der Probe. (modifiziert nach [25])

Zwischen der spektralen Auflösung $d\tilde{\nu}$, der Anzahl an Spektralkanälen M_ν und der Anzahl benötigter Interferenzbilder M_I besteht der folgende Zusammenhang:

$$d\tilde{\nu} = \frac{\Delta\tilde{\nu}}{M_\nu} = \frac{\tilde{\nu}_{ref}}{ua \cdot M_\nu} = \frac{2\tilde{\nu}_{ref}}{ua \cdot M_I}. \quad (17)$$

Für eine spektral hochauflösende Messung eignet sich folgende Wahl der Parameter:

$\tilde{\nu}_{ref}$	Abtastfrequenz (Referenzlaser bei 543 nm):	18416 cm^{-1} ,
$\Delta\tilde{\nu}$	spektrale Bandbreite:	9208 cm^{-1} ,
M_ν	Anzahl der Spektralkanäle innerhalb von $\Delta\tilde{\nu}$:	2048,
ua	Faktor der Unterabtastung:	2 (einfache Unterabtastung),
M_I	Anzahl der Interferenzbilder (doppelseitig):	4096,
$d\tilde{\nu}$	spektrale Auflösung:	4,4 cm^{-1} .

In dieser Arbeit wurden doppelseitige Stapel aufgezeichnet, welche entweder aus 1024 oder 4096 Interferenzbilder bestanden um spektrale Auflösungen von jeweils 18 cm^{-1} oder 4,4 cm^{-1} zu erreichen. Abhängig von der Probe wurden für eine OPD Belichtungszeiten zwischen 200 ms und 1 s gewählt.

Der grobe Abgleich des Interferometers ($OPD = 0$) erfolgte nach allen anderen Justierschritten anhand des Lichtes einer Glühlampe. Zum präzisen Abgleich wurden bei jeder Messung stets zusätzliche Interferenzbilder mit langen OPDs aufgezeichnet, die es gestatten bei der späteren Datenauswertung einen um $OPD = 0$ symmetrischen Teilstapel auszuwählen. Die exakte Zentrierung der Interferogramme (auch zwischen zwei Bildern) erfolgt nach der Fourier-Transformation derselben durch die Phasenkorrektur der Spektren (siehe Phasenkorrektur der Spektren).

2.4. Das Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometer

Die in Kapitel 2.2. beschriebene Lichtschichtbeleuchtung lässt sich direkt mit dem in Kapitel 2.3. beschriebenen Fourier-Transformations-Spektrometer zu einem Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometer kombinieren (siehe Abbildung 13).

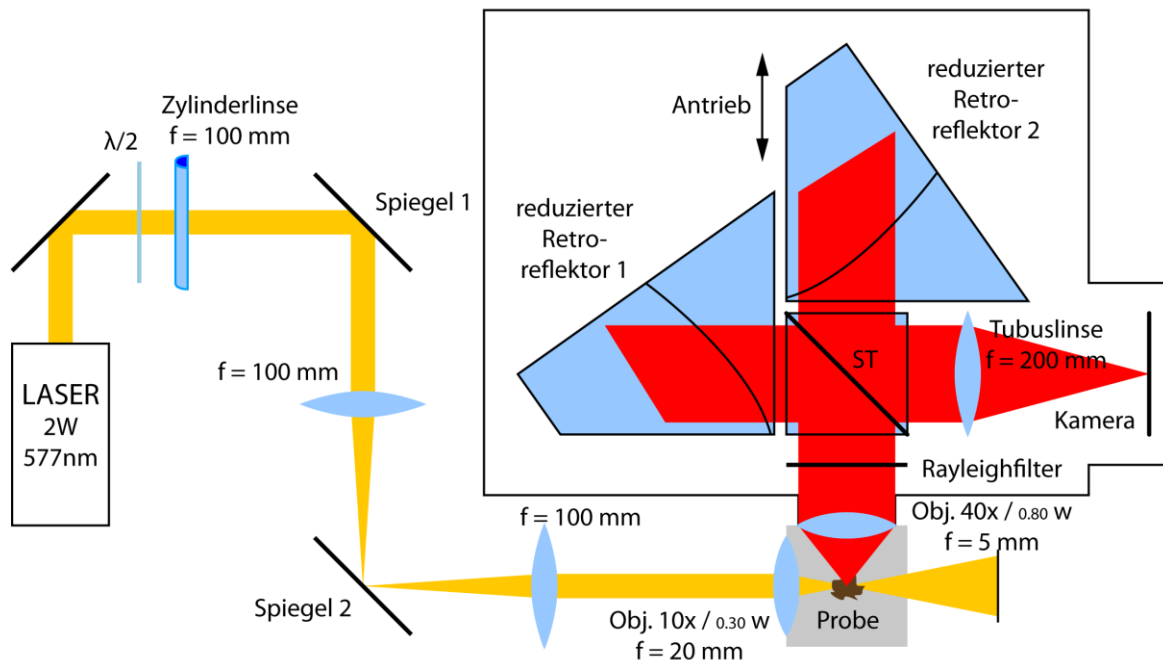


Abbildung 13: Optischer Aufbau aus Lichtschichtbeleuchtung (gelb) und stabilem Interferometer (rot). Der Retroreflektor 2 ist frei verschiebbar auf der piezomotorisierten Bühne angebracht. Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Helium-Neonlaser (543 nm) nicht dargestellt. (modifiziert nach [25])

Mit Hilfe einer großen OPD im Interferometer ist das Mikroskop als breitbandiges Lichtschicht-Raman-Mikroskop verwendbar. Auf diese Weise lässt sich leicht die gesamte Probe in Echtzeit beobachten und positionieren. Besteht der Strahlteiler des Interferometers aus zwei baulich getrennten Teilen, müssen beide so justiert werden, dass ihre Bilder aus dem Interferometer auf dem Kamerasensor direkt übereinander liegen.

Die Lambda-Halbe-Platte zur Einstellung der Polarisationsrichtung der Beleuchtung sollte zunächst so eingestellt werden, dass der E-Feld Vektor senkrecht zur optischen Achse des Beleuchtungs- und der optischen Achse des Detektionsobjektives ausgerichtet ist. Auf diese Weise steht die Detektionsoptik im Winkel der größten Streulichtemission.

2.5. Die Präparation von Proben

In der Lichtschicht-Fluoreszenz-Mikroskopie (LSFM) werden Proben häufig in einem 1 mm bis 2 mm dicken Zylinder aus niedrigschmelzender Agarose (50° C) eingebettet und orthogonal zu Beleuchtungs- und Detektionsobjektiv frei positionierbar in eine mit Wasser gefüllte Kammer gehängt [20]. Für die mit ausgedehnten Untersuchungszeiten arbeitende Lichtschicht-Raman-Mikrospektroskopie (LSRM) reicht die Stabilität dieses Verfahrens nicht aus.

Eine ideale Probe für die LSRM ist weitgehend transparent, nicht fluoreszent, Raman aktiv und stabil eingebettet. Die typischen, langen Belichtungszeiten von mehreren Minuten für alle Interferenzbilder führen häufig zu nicht mehr korrigierbaren Driften der Probe. Die hohen Anregungsleistungen können zusätzlich zu lokalem Aufschmelzen der Agarose führen.

In dieser Arbeit wurde daher eine neue Halterungsstrategie entwickelt. Statt der niedrigschmelzenden Agarose wird Standard-Agarose mit einem Schmelzbereich von 80 - 95° C und einer Konzentration von 2% in gefiltertem Wasser verwendet. Sie wird zusammen mit der Probe in einen löffelförmigen Halter aus schwarz lackiertem Aluminium gegossen. Nach dem Erstarren befindet sich die Probe so noch immer in Wasserimmersion und wird mechanisch ausreichend stabil für die LSRM gehalten (siehe Abbildung 14).

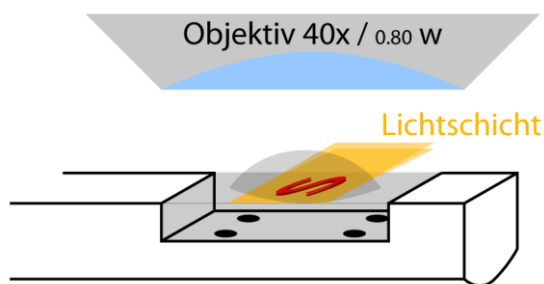


Abbildung 14: Halterung der in Agarose eingebetteten Probe (rotes S) in einem löffelförmigen Halter aus Aluminium (waagerechte Darstellung). Zusätzlich dargestellt sind das beobachtende Mikroskop-Objektiv und die Lichtschicht. (modifiziert nach [25])

Für sehr kleine Proben wie z.B. Polystyrol-Kugeln (PS) mit 2,2 μm Durchmesser oder Polymethylmethacrylat-Kugeln (PMMA) mit 6,0 μm Durchmesser kann es von Vorteil sein, diese auf einen ebenen Objektträger aufzubringen. Er lässt sich aus Agarose leicht herstellen, indem der löffelförmige Halter mit einem Tropfen geschmolzener Agarose benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt wird. Ist der Tropfen erstarrt, kann das Glas vorsichtig heruntergeschoben werden. Es entsteht eine sehr glatte Ebene, die Proben tragen kann. Mit einem weiteren Tropfen geschmolzener Agarose lässt sich diese fixieren bzw. eingießen.

2.6. Bilddatenverarbeitung

Das Ergebnis einer Messung mit dem LSRM ist ein doppelseitiger Stapel aus typischerweise 1024 oder 4096 rohen Interferenzbildern $R(OPD, x, y)$ bei verschiedenen OPDs. Eine Kette von Bildbearbeitungsschritten ist notwendig, bevor ein hyperspektrales Raman-Bild zur weiteren Analyse und Darstellung zur Verfügung steht.

2.6.1. Erzeugung von Spektren aus Interferogrammen

2.6.1.1. Normalisierung der Rohbilder

Als erster Schritt werden die Interferenzbilder aller OPDs normalisiert. Dies geschieht durch Abziehen des Dunkelbildes $D(x, y)$ von jedem rohen Interferenzbild $R(OPD, x, y)$ und Division mit einem Weißbild $W(x, y)$:

$$N(OPD, x, y) = \frac{R(OPD, x, y) - D(x, y)}{W(x, y)}. \quad (18)$$

Das Dunkelbild ist dabei der Mittelwert aus 1000 rohen Dunkelbildern der Kamera, wobei die gleichen Einstellungen wie für die Datenaufnahme verwendet wurden. Das Weißbild $W(x, y)$ ist das schwebeteilchen- und dunkelbildbereinigte Mittelwertbild aus 1000 rohen Raman-Bildern einer reinen Wasserprobe, die mit der Lichtschicht beleuchtet ist. Das Interferometer ist dabei auf eine konstante und lange OPD eingestellt. Die Bereinigung um Schwebeteilchen erfolgt dabei durch pixelweise Medianbildung und Verwerfen der 10% hellsten und dunkelsten Pixel in den rohen Aufnahmen der Wasserprobe.

Diese Schritte normalisieren den Detektor der sCMOS-Kamera für den in der Messung erwarteten Helligkeitsbereich. Es werden pixelweise Unterschiede in der Empfindlichkeit des Detektors ausgeglichen, die auf Staubablagerungen nahe der Bildebene, Unterschiede in der Quanteneffizienz oder der elektronischen Verstärker zurückzuführen sind. Außerdem wird der Helligkeitsabfall an den Rändern der gaußförmigen Lichtschicht ausgeglichen.

2.6.1.2. Driftkorrektur der Probe

Der Normalisierung der Interferenzbilder folgt eine laterale Driftkorrektur der Probe. Diese ist nötig, da sich die Probe auch mit der neuen Halterungsstrategie um bis zu 2 $\mu\text{m}/\text{h}$ bewegen kann. Ohne Korrektur wäre die Annahme der Fourier-Transformations-Spektrometer verletzt, dass sich die Probe während einer Messung nicht verändert. Spektrale Rekonstruktionsartefakte an Kanten wären die Folge.

Für die Korrektur werden die Interferenzbilder in Gruppen zu je 8 aufeinanderfolgenden Bildern zusammengefasst und gemittelt. Die Drift wird durch Kreuzkorrelation zwischen dem ersten Durchschnittsbild mit allen anderen Durchschnittsbildern bestimmt. Der Befehl „findshift“ der Matlab toolbox DIPimage [46] erledigt dies iterativ mit Subpixelgenauigkeit.

Die Treffsicherheit des Verfahrens lässt mitunter gerade in der Mitte der Interferogramme etwas nach, da hier kontrastreiche und sehr breite (bei guter Justierung des Interferometers das gesamte Bild erstreckende) Interferenzstreifen entstehen, die die Probenstruktur überlagern. Die Strategie über 8 aufeinanderfolgende Bilder zu mitteln, vermindert diesen Effekt, gleicht ihn jedoch nicht vollständig aus. Daher werden die Ergebnisse der Kreuzkorrelation zusätzlich um Ausreißer von über einem Pixel von Gruppe zu Gruppe bereinigt, bevor durch Interpolation mit einer Spline der Korrekturvektor $\vec{s}(OPD)$ für jedes Einzelbild errechnet wird.

Mit dem Befehl „shift“ aus DIPimage werden die ermittelten Korrekturvektoren $\vec{s}(OPD)$ auf jedes einzelne, normalisierte Bild angewendet. Der shift-Befehl besteht dabei aus einer 2D-Fourier-Transformation, der Multiplikation mit einer entsprechenden Phasenrampe im 2D-Fourier-Raum und einer inversen 2D-Fourier-Transformation:

$$N'(OPD, x, y) = \Re \left(\mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F}\{N(OPD, x, y)\} \cdot e^{-i\pi \frac{x}{\max(x)} \cdot s_x(OPD)} \cdot e^{-i\pi \frac{y}{\max(y)} \cdot s_y(OPD)} \right\} \right) .(19)$$

Er erreicht somit ebenfalls Subpixelgenauigkeit. Nach diesem Schritt kann optional ein Pixel Binning (Zusammenfassung benachbarter Pixel) erfolgen, um Daten zu reduzieren und das SNR zu verbessern. Binning ist nur sinnvoll, solange das örtliche Abtasttheorem erfüllt bleibt. Verbleibende Positionierungsunsicherheiten führen an Bildkanten und -details zu einem typischerweise niederfrequenten Pseudosignal in den rekonstruierten Spektren (siehe Abbildung 12) und zu einer Reduktion der lateralen Bildauflösung.

2.6.1.3. **Bleichkorrektur**

Ein weiterer Effekt, der die Voraussetzung einer unveränderlichen Probe verletzt, ist das Bleichen von Fluoreszenzsignalen während der Aufnahme eines Interferenzstapels. Da Bleichen auf sehr langen Zeitskalen vor sich geht und im Wesentlichen nur in einem exponentiellen Zerfall besteht, ergibt sich nur bei Frequenzen nahe der Nullfrequenz ein Pseudosignal in der Rekonstruktion (siehe Abbildung 12). Im Falle der einfachen Unterabtastung fallen Nullfrequenz, Referenzfrequenz des Helium-Neon-Lasers und das Pseudosignal zusammen. Durch die großen Frequenzabstände zwischen Raman-Signal und dem bei der Fourier-Transformation entstehenden Pseudosignal kann dieses hier prinzipiell ignoriert werden. Versuche, den exponentiellen Zerfall des Fluoreszenz-Hintergrundes pixelweise abzuschätzen und abzuziehen, konnten das Entstehen des Pseudosignals spürbar abschwächen. Eine Vermeidung von Fluoreszenz bei der Messung durch Bleichen oder die geschickte Wahl des Anregungslasers ist dieser Korrektur aus SNR-Gründen bei der Fourier-Transformation jedoch vorzuziehen (siehe auch Kapitel 3.2.).

2.6.1.4. *Fourier-Transformation*

Nach diesen Korrekturen wird das hyperspektrale Bild durch pixelweise 1D-Fourier-Transformation aus dem Stapel aus Interferenzbildern gewonnen:

$$S_{\mathbb{C}}(\nu, x, y) = \mathcal{F}\{N'(OPD, x, y) \cdot w(OPD)\}. \quad (20)$$

Dabei wird zuvor eine Fensterfunktion in OPD-Richtung auf die Daten angewendet um Artefakte der Fourier-Reihenentwicklung zu unterdrücken, die gerade durch den Sprung in der Intensität von erstem zu letztem Interferenzbild auftauchen (z.B. durch exponentielle Bleichen). Das verwendete, modifizierte Hann-Fenster $w(OPD)$ blendet ein Sechzehntel der positivsten und negativsten OPDs kosinusförmig über in deren Durchschnitt ohne spürbar Hochfrequenzinformation zu entfernen. Das Ergebnis der Fourier-Transformation ist ein hyperspektrales Bild $S_{\mathbb{C}}(\nu, x, y)$, welches aus einem komplexen Spektrum für jeden Pixel (x, y) besteht (8123 cm^{-1} bis -1085 cm^{-1} bezogen auf die Anregung von 577 nm).

2.6.2. *Korrektur der Spektren*

2.6.2.1. *Phasenkorrektur der Spektren*

Alle Spektren des fertigen Bildes sollten nur den Realteil besitzen, weil sie unter Ausnutzung des Wiener-Chintschin-Theorems aus der Autokorrelation eines reellen Signals entstanden sind. Da aus experimentellen Gründen nicht alle Interferogramme exakt symmetrisch um $OPD = 0$ des Interferometers aufgezeichnet werden können, ist die Information mit einer typischerweise linear zur OPD ansteigenden Instrument-Phasenfunktion $\varphi(\nu)$ auf Real- und Imaginärteil verteilt [36]. Auf den ersten Blick kann die Phase durch Betragsbildung für jede Frequenz im Spektrum vernachlässigt werden $|S_{\mathbb{C}}(\nu, x, y)|$. Dadurch würde jedoch Information über das Rauschen als ein weiterer Beitrag zur Asymmetrie eines Interferogramms verloren gehen.

Wird stattdessen der Realteil eines zuvor phasenkorrigierten Spektrums verwendet, führt das zu einer deutlichen Verbesserung des Rauschabstandes gerade für kleine Signale. Es sind zwei mathematisch identische Ansätze zur frequenzabhängigen Phasenkorrektur eines einzelnen Spektrums bekannt [47], [48]. Der erste beruht auf einer Verschiebung des Interferogramms mit Subpixelgenauigkeit durch Faltung mit einem entsprechenden Kern (im Realraum), der zweite beruht auf der Multiplikation des Spektrums mit einer entgegengesetzten Phasenfunktion (im Fourier-Raum). Beide werden in [49] praktisch verglichen. Allgemein ist die Instrument-Phasenfunktion $\varphi(\nu, x, y)$ eines bildgebenden Interferometers nicht nur frequenzabhängig sondern auch ortsveränderlich.

2.6.2.1.1. Das Phasenkorrekturverfahren

Die Instrument-Phasenfunktion $\varphi(v, x, y)$ eines bildgebenden Interferometers in einer separaten Messung genau zu bestimmen ist aufwändig und birgt die Gefahr, dass eine mechanische Drift des Aufbaus alle Korrekturanstrengungen zunichte macht. Ein Verfahren, dass die Instrument-Phasenfunktion $\varphi(v, x, y)$ aus jedem einzelnen Datensatz selbst bestimmen kann, ist daher zu bevorzugen.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, dass nur die langsame Veränderlichkeit der Instrument-Phasenfunktion $\varphi(v, x, y)$ bezüglich der Frequenz und des Ortes ausnutzt. Diese Annahme ist für kleine Symmetrieabweichungen in den Interferogrammen zulässig. Damit lässt sich die Instrument-Phasenfunktion aus einem hyperspektralen Bild $S_{\mathbb{C}}(v, x, y)$ nach Tiefpassfilterung bzw. Faltung mit $g(v, x, y)$ wie folgt abschätzen:

$$\varphi(v, x, y) = \arg(S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \otimes g(v, x, y)) \quad (21)$$

bzw.:

$$\varphi(v, x, y) = \text{atan2} \left(\Im(S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \otimes g(v, x, y)), \Re(S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \otimes g(v, x, y)) \right). \quad (22)$$

Dabei ist $g(v, x, y)$ ein gaußförmiger 3D-Faltungskern mit den Standardabweichungen σ_v , σ_x und σ_y :

$$g(v, x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_v^2}} e^{-\frac{v^2}{2\sigma_v^2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_x^2}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma_x^2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_y^2}} e^{-\frac{y^2}{2\sigma_y^2}}. \quad (23)$$

Die Standardabweichungen müssen so gewählt werden, dass innerhalb dieser keine Veränderung des Anstieges der Instrument-Phasenfunktion zu erwarten ist. Es kamen folgende Standardabweichungen zum Einsatz: $\sigma_v = 4$, $\sigma_x = 20$, $\sigma_y = 20$. Das phasenkorrigierte, hyperspektrale Bild $S(v, x, y)$ entsteht durch Multiplikation mit dem Phasenterm:

$$S(v, x, y) = S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \cdot e^{-i\varphi(v, x, y)}. \quad (24)$$

Gleiches lässt sich auch als komplexwertige Division durch das Tiefpass gefilterte und normalisierte hyperspektrale Bild $S_{\mathbb{C}}(v, x, y)$ ausdrücken:

$$S(v, x, y) = \frac{S_{\mathbb{C}}(v, x, y)}{\frac{S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \otimes g(v, x, y)}{|S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \otimes g(v, x, y)|}}. \quad (25)$$

Hier ist deutlich ersichtlich, dass die Instrument-Phasenfunktion $\varphi(v, x, y)$ nicht explizit bestimmt werden muss. Nach diesem Schritt lässt sich der Realteil vom phasenkorrigierten Spektrum bilden:

$$S_{\Re}(v, x, y) = \Re(S(v, x, y)). \quad (26)$$

Durch weitere Vereinfachung kann Rechenzeit gespart werden und es ergibt sich die in dieser Arbeit implementierte Form:

$$S_{\Re}(v, x, y) = \frac{\Re(S_{\mathbb{C}}(v, x, y)) \cdot \Re(B(v, x, y)) + \Im(S_{\mathbb{C}}(v, x, y)) \cdot \Im(B(v, x, y))}{|B(v, x, y)|} \quad (27)$$

mit dem komplexen und Tiefpass gefilterten hyperspektralen Bild:

$$B(v, x, y) = S_{\mathbb{C}}(v, x, y) \otimes g(v, x, y) . \quad (28)$$

Dadurch wird das Phasenrauschen über viele Voxel¹ gemittelt und das Signal wird für jedes Voxel entlang der reellen Achse ausgerichtet (siehe Abbildung 15). Eine andere Sichtweise ist, dass die in der Bandbreite begrenzte Phaseninformation um höhere Frequenzanteile, die nach Annahme der langsamen Veränderlichkeit nur Rauschen tragen, bereinigt wird.

Die Methode erwies sich in dieser Arbeit als sehr robust. Durch die Wahl nur des Realteils des phasenkorrigierten hyperspektralen Bildes $S(v, x, y)$ wird der stets positive Beitrag des RMS-Rauschens eliminiert und es verbleibt ein um Null zentriertes, gaußförmiges Rauschen. Dieses lässt sich auch nach der Fourier-Transformation durch Mittelung über mehrere Pixel, bzw. Voxel unterdrücken, da es keinen Gleichanteil mehr besitzt. Für weitere Auswertelgorithmen ist bemerkenswert, dass das Rauschen von dispersiven Spektrometern für jeden Spektralkanal poissonverteilt, jenes von Fourier-Transformations-Spektrometern jedoch gaußverteilt ist. Eine ausführliche SNR-Diskussion verschiedener Spektrometer-Typen erfolgt in Kapitel 3.2..

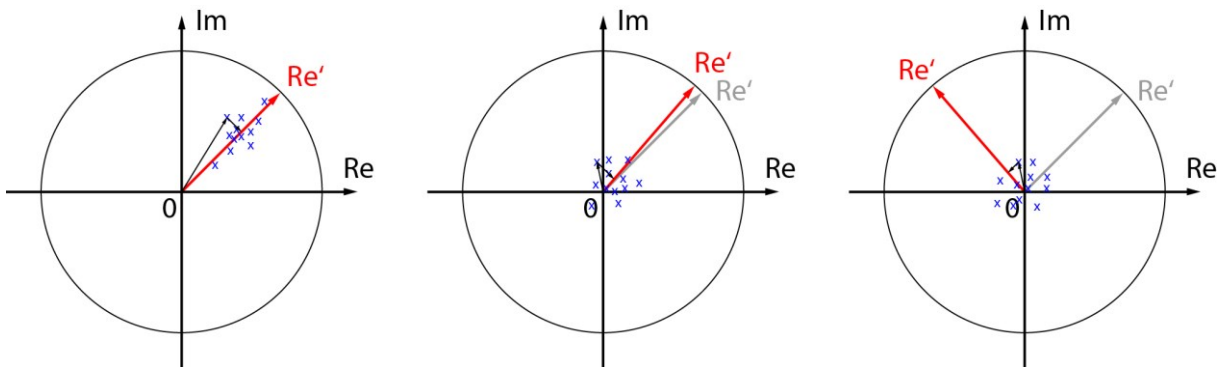


Abbildung 15: Prinzip der Phasenkorrektur der gewonnenen Spektren am Beispiel von verschiedenen Signalintensitäten (links: mittel, Mitte: schwach, rechts: extrem schwach). Die Phasenkorrektur schätzt die tatsächliche Phase (grau) durch Mittelung über die Phase mehrerer, rauschender Voxel aus dem hyperspektralen Bild (blau) ab und liefert für starke bis schwache Signale ein zuverlässiges Ergebnis Re' (rot). Durch anschließendes Bilden des Real-teils werden alle Voxel (blau) in Richtung des neuen Realteils Re' (rot) abgebildet.

¹ Analog zum Pixel als das kleinste Flächenelement aus einem 2D-Bild ist das Voxel das kleinste Volumenelement aus der 3D-Datenstruktur eines hyperspektralen Bildes.

2.6.2.1.2. Grenzen des Phasenkorrekturverfahrens

Ein Kriterium für die Anwendbarkeit des Verfahrens lässt sich mit Hilfe einer Rauschbetrachtung gewinnen. Um ein besseres Ergebnis für die Ausrichtung des Signals $S_{\mathbb{C}}(v, x, y)$ entlang der reellen Achse zu erhalten als dies die bloße Betragsbildung erlaubt, sollte das SNR von jedem Pixel des Tiefpass gefilterten hyperspektralen Bildes $B(v, x, y) > 1$ sein. Das SNR lässt sich aus dem reellen Signal $S_{\Re}(v, x, y)$ und einem komplexen und nicht korrelierten Rauschen $N(v, x, y)$ wie folgt berechnen:

$$SNR = \frac{\sum(S(v, x, y) \cdot g(v, x, y))}{\sqrt{\sum(N(v, x, y) \cdot g(v, x, y))^2}} > 1. \quad (29)$$

Nimmt man eine konstante Verteilung von Signal $S(v, x, y)$ und Rauschen $N(v, x, y)$ über alle Voxel an, so lässt sich das SNR abschätzen durch:

$$SNR = \frac{s}{|n|} \frac{\sum g(v, x, y)}{\sqrt{\sum g(v, x, y)^2}} \approx \frac{s}{|n|} \frac{\int g(v, x, y)}{\sqrt{\int g(v, x, y)^2}} = \frac{s}{|n|} \sqrt{(2\sqrt{\pi})^3 \sigma_v \sigma_x \sigma_y}. \quad (30)$$

Dabei sind s und n die Erwartungswerte von Signal und Rauschen. Die Bedingung für eine funktionierende Phasenkorrektur ist somit für ein bestimmtes Tiefpassfilter $g(v, x, y)$ mit ($\sigma_v = 4, \sigma_x = 20, \sigma_y = 20$) gegeben durch:

$$\frac{|n|}{s} < \sqrt{(2\sqrt{\pi})^3 \sigma_v \sigma_x \sigma_y} \quad \text{mit:} \quad \sqrt{(2\sqrt{\pi})^3 4 \cdot 20 \cdot 20} = 267. \quad (31)$$

Liegt das (etwa gleichmäßig verteilte) Rauschen der Voxel des hyperspektralen Bildes $S_{\mathbb{C}}(v, x, y)$ höchstens 267-fach über dem mittleren Signal, so ist eine Verbesserung des Rauschabstandes durch das oben beschriebene Verfahren zu erwarten. Anderenfalls wird der Phasenwinkel von $S_{\mathbb{C}}(v, x, y)$ in eine zufällige, falsche Richtung gedreht, was ähnlich auch bei der einfachen Betragsbildung passieren würde (siehe Abbildung 15 rechts). Auch dann hat das Ergebnis den Vorteil, dass das Rauschen keinen Gleichanteil mehr besitzt und es somit bei Mittelung über mehrere Voxel reduziert wird. Leider gilt das dann auch für Signale 267-fach unter dem Rauschen. In diesen Fällen ist das Signal jedoch ohnehin praktisch nicht mehr existent.

2.6.2.2. Winkelkorrektur im Interferometer

Das Interferometer wird im Strahlengang des Mikroskopobjektivs nicht nur von kollimiertem Licht aus einer Richtung beleuchtet. Stattdessen wird es in Luft in einem Winkelbereich von:

$$\beta_{max} = \pm \sin^{-1} \left(\frac{\sqrt{2} \cdot d_c}{2f_T} \right) \approx \pm 2,70^\circ \quad (32)$$

benutzt.

Der Winkelbereich wird durch die Diagonale des Detektors $\sqrt{2} \cdot d_c$ und die verwendete Tubuslinse mit der Brennweite f_T festgelegt. Er führt in den Interferenzbildern zu einer transversalen Positionsabhängigkeit der Abtastperiode der OPD (siehe Abbildung 16 und [36]).

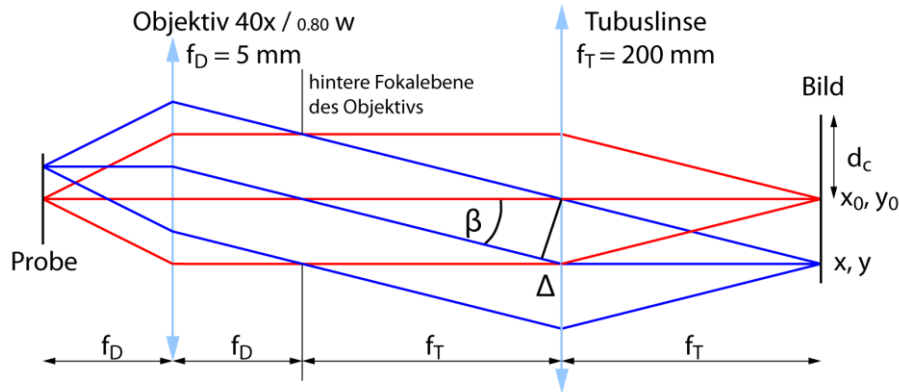


Abbildung 16: Entstehung der transversalen Positionsabhängigkeit der Abtastperiode der OPD .

Diese skaliert mit dem Winkel β der kollimierten Strahlung im Interferometer:

$$OPD = OPD_0 \cdot \frac{1}{\cos(\beta)}. \quad (33)$$

Im Spektrum ist der Effekt besonders bei hohen Frequenzen, also geringen Stokes-Verschiebungen, ersichtlich. Die OPD für einen beliebigen Detektorpixel mit der Position x, y lässt sich aus der OPD_0 für den Pixel auf der optischen Achse x_0, y_0 berechnen:

$$OPD(x, y) = OPD_0 \cdot \frac{\sqrt{f_T^2 + (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}}{f_T}. \quad (34)$$

Um eine positionsabhängige Frequenzskala im hyperspektralen Bild zu vermeiden, muss für spektrale Auflösungen besser als 20 cm^{-1} eine Korrektur dieses Winkeleffektes durchgeführt werden. Die Korrigierte OPD' ergibt sich für jeden Pixel x, y aus der gemessenen OPD :

$$OPD' = OPD(x, y) \cdot \frac{f_T}{\sqrt{f_T^2 + (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}}. \quad (35)$$

Für die durch Fourier-Transformation gewonnene Frequenzskala ν gilt der reziproke Zusammenhang:

$$\nu' = \nu(x, y) \cdot \frac{\sqrt{f_T^2 + (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}}{f_T}. \quad (36)$$

Die Entwicklung in eine Potenzreihe nach x und y auf der optischen Achse ($x_0 = y_0 = 0$) ergibt:

$$v' = v(x, y) \cdot \left(1 + \frac{1}{2f_T^2} \cdot x^2 + \frac{1}{2f_T^2} \cdot y^2 - \frac{1}{4f_T^4} \cdot x^2 y^2 + O[x, y]^4 \right). \quad (37)$$

Da x und y viel kleiner als f_T sind, genügt es, die ersten Terme der Potenzreihe zu berücksichtigen. Mit den Pixelkoordinaten x_0, y_0 der optischen Achse ergibt sich somit:

$$v' = v(x, y) \cdot \left(1 + \frac{1}{2f_T^2} \cdot ((x - x_0)^2 + (y - y_0)^2) \right). \quad (38)$$

Nur in einem perfekt justierten Interferometer würde die optische Achse (x_0, y_0) exakt in der Mitte der Kamera liegen. Sie bleibt somit experimentell zu bestimmen. In dieser Arbeit geschah dies anhand der Spektren einiger zufällig in einer Ebene verteilter Polymethylmethacrylat-Kugeln (PMMA). PMMA besitzt ein sehr starkes Raman-Signal bei 803 cm^{-1} , der laut [50] von einer symmetrischen Streckschwingung der $C - O - C$ Verbindung her rührt. Aus dem mittleren Spektrum jeder einzelnen dieser PMMA-Kugeln wird mit Subpixelgenauigkeit die spektrale Peak-Position im hyperspektralen Bild bestimmt. Durch Einpassen einer polynomischen Fläche $sf(x, y)$ zweiter Ordnung für x und y mit der Matlab-Funktion „fit“ und dem Modell „poly22“ lassen sich alle p-Parameter des Modells

$$sf(x, y) = p_{00} + p_{10}x + p_{01}y + p_{20}x^2 + p_{11}xy + p_{02}y^2. \quad (39)$$

bestimmen. Analytisch lässt sich leicht die Position x_0, y_0 des Maximums des Polynoms $sf(x, y)$ errechnen. Das Ergebnis lässt sich iterativ verbessern, wobei nach jedem Zyklus die transversalen Peak-Positionen x und y um die Mittenposition x_0 und y_0 bereinigt werden, bevor erneut die polynomische Fläche eingepasst wird. Bereits 3 Zyklen liefern nicht nur ein sehr stabiles Ergebnis für die Mittenposition x_0 und y_0 , sondern bestätigt auch:

$$p_{20} = p_{02} = \frac{1}{2f_T^2}. \quad (40)$$

Aus Symmetriegründen sind p_{10} , p_{01} und p_{11} bis auf Fluktuationen gleich null. Die Korrektur des hyperspektralen Bildes erfolgt durch Dehnung der einzelnen Spektren entsprechend (36). Numerisch wurde sie mit Hilfe der Matlab-Funktion „resample“ und einem „lanczos8“-Interpolationskern durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass bei einem unterabgetasteten Spektrum die Dehnung um die physikalische Nullfrequenz erfolgt. Ein unterabgetastetes Spektrum wird so zusätzlich verschoben. Bei der Umsetzung in Matlab wurde aus Performancegründen auf eine Doppelschleife über alle Spektren verzichtet. Stattdessen wurden Spektren mit ähnlichen Dehnparametern zusammengefasst und parallel verarbeitet.

Nach dieser Rohdatenverarbeitung sind homogene hyperspektrale Bilder entstanden, die mit verschiedenen Analyseverfahren weiterverarbeitet werden können. Sie sind untereinander und mit Ergebnissen anderer Methoden der Raman-Spektroskopie vergleichbar.

2.6.3. Reduzierung des Schattenwurfs in der LSRM

Eine bekannte Herausforderung in der Lichtschichtmikroskopie ist der Schattenwurf, welcher durch lokale Absorption, Brechung oder Streuung in der Probe hervorgerufen wird [51]. In der Fluoreszenz-Lichtschichtmikroskopie sind aufwändige Algorithmen zur Abschätzung der ungleichmäßigen Beleuchtung erforderlich [52]. Alternativ gibt es Ansätze die Probe aus verschiedenen Richtungen zu beleuchten und zu beobachten [33], [53]. Diese Ansätze sind auch auf die LSRM anwendbar, jedoch lässt sich unter Ausnutzung der gesamten Spektralinformation eine ungleichmäßige Beleuchtung sehr viel einfacher, wirkungsvoll kompensieren.

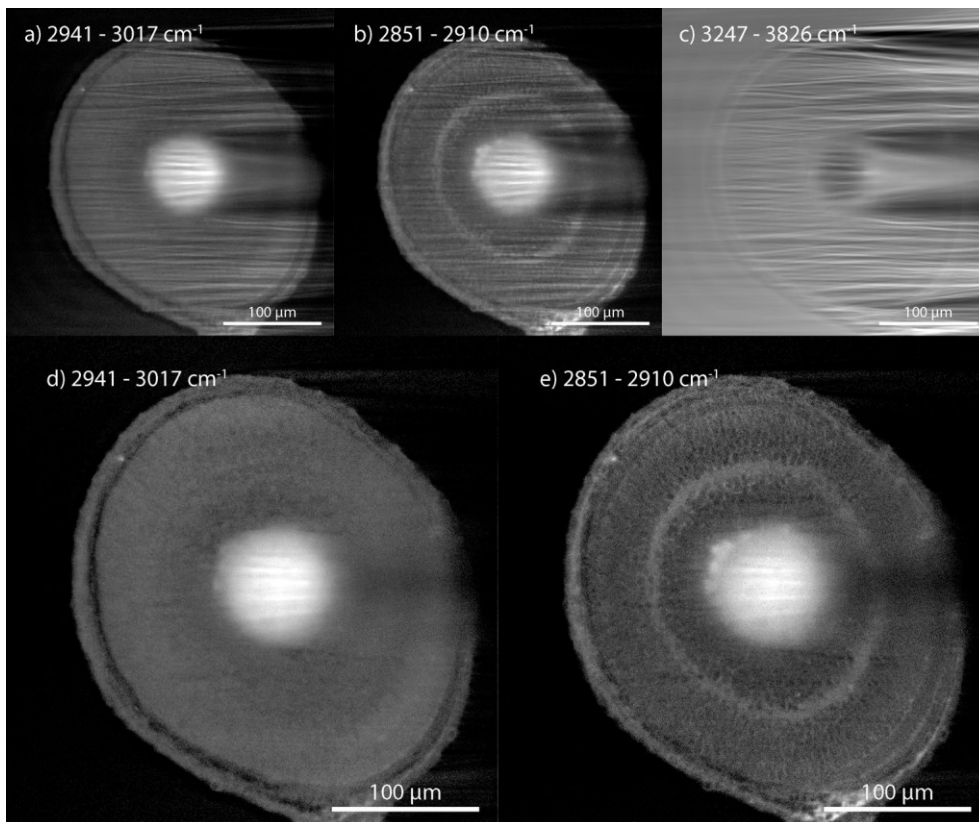


Abbildung 17: Reduktion von Schatten in der Lichtschichtbeleuchtung mittels Division durch das Wassersignal. Das Verfahren ist am Beispiel des Auges eines Zebrafischembryos (*Danio rerio*), eingebettet in 2% Standard-Agarose, aufgenommen mit einer Bestrahlungsstärke von $870 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ über 1 h 8 min und spektraler Auflösung von $4,4 \text{ cm}^{-1}$, gezeigt. **(a)** Raman-Signal im Wellenzahlbereich zwischen 2941 cm^{-1} und 3017 cm^{-1} **(b)** Raman-Signal im Wellenzahlbereich zwischen 2851 cm^{-1} und 2910 cm^{-1} **(c)** Wassersignal im Bereich zwischen 3247 cm^{-1} und 3826 cm^{-1} , **(d)** Schattenreduktion durch Division von (a) durch (c), **(e)** Division von (b) durch (c). (nach [25])

Für eine in Wasser bzw. Agarose eingebettete biologische Probe kann eine homogene Wasserverteilung angenommen werden. Ein einzelnes Wassermolekül besitzt dabei drei Raman und IR aktive Schwingungsfreiheitsgerade: eine symmetrische Streckschwingung bei 3657 cm^{-1} , eine Biegeschwingung bei 1595 cm^{-1} und eine asymmetrische Streckschwingung bei 3756 cm^{-1} [54]. In der Flüssigkeit trägt hauptsächlich die symmetrische Streckschwingung zum Raman-Spektrum bei [3], welche sich durch H-Brückenbindung auf 5 Bänder um 3400 cm^{-1} verteilt [54]. Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigten im Bereich zwischen 3250 cm^{-1} und 3825 cm^{-1} ein sehr starkes Wassersignal, ohne dass dieses von anderen starken Signalen (NH- und NH₂-Streckschwingungen von Amiden können im gleichen Bereich vorkommen [30]) gestört wurde. In [6] sind im gleichen Wellenzahlenbereich ebenfalls keine Signale, die mit biologischen Proben verbunden sind, benannt. Mittels Division durch dieses Wassersignal können Ungleichmäßigkeiten in der Probenbeleuchtung effizient ausgeglichen werden, berücksichtigt aber nicht, dass sich die Lichtschicht durch die Probe auch in z-Richtung verbreitert. Dennoch wird die Bildqualität deutlich verbessert (siehe Abbildung 17).

2.6.4. Darstellung der spektralen Daten

Wird auf die zuvor beschriebene Weise ein doppelseitiger Stapel aus $M_I = 2 \cdot M_y$ Interferenzbildern zu je $M_x \cdot M_y$ Pixeln mit 32 Bit Gleitkomma ($b = 4\text{ Byte}$) im Ganzen umgerechnet, so entsteht ein reelles hyperspektrales Bild einer Schicht der Probe mit M_y Spektralkanälen und einer Größe von:

$$M_x \cdot M_y \cdot M_z \cdot M_v \cdot b = 2048 \cdot 2048 \cdot 1 \cdot 2048 \cdot 4\text{ Byte} \approx 34,4\text{ GByte} . \quad (41)$$

Die in dem Beispiel gewählte Anzahl an Interferenzbildern ermöglicht dabei eine spektrale Auflösung von $4,4\text{ cm}^{-1}$. Anhand eines Zebrafischembryos wird in dieser Arbeit mit 50 Schichten ($M_z = 50$) die Fähigkeit der 3D-Volumenbildgebung der LSRM demonstriert. Es entsteht eine vierdimensionale Datenstruktur (ein 3D-hyperspektrales Bild) mit Hypervoxeln als kleinste Elemente. Jedes Spektrum H_j eines hyperspektralen Bildes H_{jv} lässt sich als Linearkombination aus Spektren S_r verschiedener Moleküle einer Probe und messbedingtem Rauschen N_{jv} betrachten. Mit der ortsabhängigen Konzentration C_{jr} der verschiedenen Moleküle lässt sich das Entstehen eines hyperspektralen Bildes leicht in Matrixschreibweise verstehen:

$$H_{jv} = C_{jr} \cdot S_{rv} + N_{jv} . \quad (42)$$

Dabei werden die Indizes der Bildkoordinaten x , y und optional z durch einen neuen Index j zusammengefasst z.B.:

$$j = x + x_{max} \cdot y + x_{max} \cdot y_{max} \cdot z . \quad (43)$$

Der Index ν nummeriert die spektrale Koordinate und der Index r verschiedene Moleküle. Chemisch identische Moleküle können aufgrund ihrer Umgebung kleine Unterschiede in ihren Raman-Spektren aufzeigen, was in dieser Beschreibung in verschiedenen Spektren S_r resultiert. Die Beleuchtung der Probe wird als konstant angenommen und die Absorption von Raman gestreutem Licht vernachlässigt. Der Wirkungsquerschnitt der Raman-Streuung sei durch die Spektren S_r erfasst.

Da das menschliche Farbsehen hyperspektrale Bilder nicht im Ganzen effizient wahrnehmen kann, müssen Projektionen gefunden werden, die zu möglichst leistungsfähigen Aussagen führen. Eine Möglichkeit hierfür ist die kanal- bzw. bandweise Betrachtung eines hyperspektralen Bildes wie in Abbildung 17. Diese Darstellung zeigt Kontraste chemischer oder funktioneller Gruppen (hier C-H Bindungen). Durch diesen einfachen Ansatz gehen jedoch viele Informationen verloren. Wünschenswert wäre der Zugriff auf die Matrix der chemischen Konzentration C_{jr} und die Matrix der Spektren der verschiedenen Moleküle $S_{r\nu}$.

Es gibt zahlreiche chemometrische Methoden, deren Ziel es ist, die maximale Information aus spektralen Datensätzen zu ziehen und diese entsprechend der Fragestellung zu ordnen [6], [55], [56]. So werden in [6] multivariate Algorithmen in Faktormethoden, Clustermethoden und Klassifizierungsmethoden unterschieden und vorgestellt. Um die Matrizen C_{jr} und $S_{r\nu}$ zu approximieren, erscheinen Faktormethoden als geeignet. Da außer dem hyperspektralen Bild $H_{j\nu}$ kein zusätzliches Wissen vorliegt, besteht die Aufgabe darin, das Bild anhand von geeignet gewählten Spektren $G_{q\nu}$ und einer dazu passenden chemischen Karte K_{jq} mit möglichst geringem Residuum $R_{j\nu}$ zu modellieren:

$$H_{j\nu} = K_{jq} \cdot G_{q\nu} + R_{j\nu} . \quad (44)$$

Der Index q nummeriert die verschiedenen, geeignet gewählten Spektren. Auch wenn diese Matrixgleichung dieselbe Struktur besitzt wie die Beschreibung des hyperspektralen Bildes oben, können die Faktoren sehr unterschiedliche Bedeutung haben. Da die Faktorisierung nicht eindeutig lösbar ist, hängt das Ergebnis stark von den Forderungen (constraints) an dieses selbst ab. Wenn K_{jq} eine Konzentrationskarte und $G_{q\nu}$ spektrale Intensitäten repräsentieren sollen, sind beide nicht negativ. Mit dieser Forderung kommt die Nicht-negative Matrix-Faktorisierung (Non-negative Matrix Factorization NMF) infrage um Spektren zu finden, denen direkt chemische Bedeutung zugesprochen werden kann [57]. Dies zeichnet die NMF gegenüber anderen multivariaten Datenanalysen wie der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis PCA), die einen Datensatz durch möglichst wenige, aussagekräftige Spektren (mit negativen Elementen) nähert und die Unabhängigkeitsanalyse (Independent Component Analysis ICA), die einen Datensatz nach unabhängigen Spektren untersucht, aus.

2.6.4.1. Nichtnegative-Matrix-Faktorisierung (NMF)

Die NMF ist in der Lage, mit einer relativ kleinen, festgelegten Anzahl von Basisvektoren K_q das hyperspektrale Bild H_{jv} zu approximieren. Voraussetzung ist, dass eine latente Struktur in dessen Spektren verborgen ist. Für die Berechnung der NMF gibt es verschiedene Algorithmen [57]. Zwei iterative Algorithmen, welche auf der multiplikativen Aktualisierung der Matrizen K_{jq} und G_{qv} basieren, sind in [58] vorgestellt. Es wird gezeigt, dass beide zu einer monotonen Verbesserung des Ergebnisses vor dem Hintergrund einer bestimmten Zielfunktion (cost function) führen (Euklidischen Norm bzw. Kullback-Leibler-Divergenz). Da die durch Fourier-Transformation gewonnenen Spektren des LSRM jeweils mit gaußverteilterm Rauschen mit spektral konstanter Standardabweichung überlagert sind, ist hier die Optimierung nach der Euklidischen Norm geeignet. Die entsprechenden multiplikativen Aktualisierungsregeln aus [58] lauten:

$$G_{qv} \leftarrow G_{qv} \frac{K_{jq}^T H_{jv}}{K_{jq}^T K_{jq} G_{qv}} \quad K_{jq} \leftarrow K_{jq} \frac{H_{jv} G_{qv}^T}{K_{jq} G_{qv} G_{qv}^T} \quad R_{jv} \leftarrow H_{jv} - K_{jq} \cdot G_{qv} . \quad (45)$$

Da das Ergebnis dieser Aktualisierungsregeln relativ langsam konvergiert (über 100 000 Iterationen sind nötig), wurde in dieser Arbeit nicht ein ganzer 4D-Datensatz eines Zebrafisches faktorisiert, sondern nur ein repräsentativer Ausschnitt. Die errechneten Spektren G_{qv} können wiederum auf einen vollen oder sogar einen anderen Datensatz angewendet werden, um diesen auf die gleichen Komponenten hin zu untersuchen. So wurde in dieser Arbeit ein einzelnes, beschnittenes hyperspektrales Bild eines Zebrafischembryos mit $4,4 \text{ cm}^{-1}$ spektraler Auflösung in 5 Komponenten mit der NMF faktorisiert. Die errechneten Spektren wurden 4-fach spektral gebinnt² und auf einen Datensatz H'_{jv} aus 50 Ebenen mit 18 cm^{-1} spektraler Auflösung angewendet. Dies geschieht durch das Bilden der Moore-Penrose pseudoinversen Matrix G_{vq}^{-1} mit dem Matlabbefehl „pinv“.

$$G_{vq}^{-1} = \text{pinv}(G_{qv}) . \quad (46)$$

$$K'_{jq} = H'_{jv} \cdot G_{vq}^{-1} \quad (47)$$

Nach dieser Separation in wenige Komponenten können die extrahierten Spektren G_{qv} durch Bezug zu einer Referenzdatenbank mit verschiedenen Biomolekülen in Verbindung gebracht werden. Die zugehörigen Karten K_{jq} bzw. K'_{jq} können als die zugehörigen Konzentrationen interpretiert werden.

² Binning: Zusammenfassung von mehreren benachbarten Bildelementen – hier Voxeln in spektraler Richtung.

Durch die NMF können hyperspektrale Bilder ohne zusätzliches Wissen auf deren wesentliche Information reduziert werden, das Ergebnis ist chemisch interpretierbar und verhält sich linear. Nachteilig sind die relativ langsame Konvergenz des Algorithmus und die Abhängigkeit des Ergebnisses von den Startparametern. So führen zu wenig angenommene spektrale Komponenten zu spektralen Überlagerungen im Ergebnis und zu viele Komponenten zum Zerfall der Spektren einzelner Biomoleküle.

Durch die NMF wird die Lokalisierung der Spektren nicht ausgenutzt. Es ist zu erwarten, dass der geschickte Gebrauch von Ähnlichkeitsannahmen benachbarter Spektren zu günstigerem Rauschverhalten führen kann. Insgesamt ermöglichen die aufbereiteten Daten der LSRM die Anwendung von multivariaten Datenanalysemethoden, was es hier zu zeigen galt.

2.6.4.2. Entfaltung (deconvolution)

Der lineare Charakter der NMF ermöglicht noch weitere Schritte der Bildverarbeitung. So lassen sich zum Ausgleich des ortsfrequenzabhängigen Transferverhaltens eines Mikroskops Algorithmen zur Entfaltung (deconvolution) anwenden. Das Ziel dabei ist, das tatsächliche Objekt \mathbf{O}_q anhand der bekannten Messdaten (Karten) K_q bei bekannter Punktspreadfunktion (PSF) h des Mikroskops zu rekonstruieren. Der Prozess der Bildgebung wird dabei als Faltung innerhalb einer Rauschfunktion N , welche entweder gauß- oder poissonverteiltes Rauschen erzeugt, modelliert [59]:

$$K_q = N(\mathbf{O}_q \otimes h). \quad (48)$$

In dieser Arbeit wurde eine 3D *a posteriori* maximum likelihood Entfaltung [60] kanalweise auf die zuvor errechneten Karten K_q angewendet. Zum Einsatz kam dabei „GenericDeconvolution“ aus einer arbeitsgruppeninternen Entfaltungsbibliothek von Prof. Rainer Heintzmann [61]. Die Abschätzung der PSF erfolgte durch Simulation einer Weitfeld-PSF mit dem Befehl „kSimPSF“ aus einer arbeitsgruppeninternen Bildbearbeitungsbibliothek von Prof. Rainer Heintzmann und Multiplikation mit einem elliptischen Gauß-Strahl entsprechend der Mitte der Lichtschicht.

Während der Entfaltung wird iterativ die Funktion $\Psi(\mathbf{f}_q)$ als Summe aus Wahrscheinlichkeitsfunktion (likelihood function) $L(\cdot)$ und Bestrafungsfunktion (penalty function) P minimiert. Die Wahrscheinlichkeitsfunktion $L(\cdot)$ misst dabei die Qualität bzw. die Wahrscheinlichkeit mit der das Modell \mathbf{f}_q die Messdaten K_q erklärt. Die Regularisierungsfunktion oder Bestrafungsfunktion P bewertet anhand von zusätzlichen Annahmen die physikalische Glaubwürdigkeit des Modells \mathbf{f}_q . Ein Parameter λ ist eingeführt um einen Kompromiss zwischen beiden Kriterien zu finden:

$$\Psi(\mathbf{f}_q) = L(\mathbf{f}_q, K) + \lambda \cdot P(\mathbf{f}_q). \quad (49)$$

Durch die Bestrafungsfunktion P wird verhindert, dass beliebig hohe Frequenzen herangezogen werden um das Messergebnis K_q zu erklären. Eine übermäßige Verstärkung von Rauschen wäre anderenfalls die Folge.

Da das Rauschen der Daten K_q aus dem Fourier-Transformations-Spektrometer gaußverteilt ist, eignet sich die Euklidische Norm (Least square) als Wahrscheinlichkeitsfunktion L . Durch den hohen und konstanten Wasserhintergrund kann die Standardabweichung dabei als räumlich konstant angesehen werden. Wegen der stets positiven Intensitäten wird im Entfaltungsprozess als Nebenbedingung Positivität des Modells f_q gefordert. Ein modifizierter Good's roughness Regularisierer [59], [62] P_{mGR} als Bestrafungsfunktion sorgt für eine glaubwürdige Struktur des Endergebnisses. Die gesamte, zu minimierende Funktion lautet somit:

$$\Psi(f_q) = \|f_q \otimes h - K_q\|^2 + \lambda_{mGR} \cdot P_{mGR}(f_q) \quad (50)$$

mit dem Good's roughness Regularisierer P_{mGR} :

$$P_{mGR}(f_q) = \sum \frac{|\vec{\nabla} f_q|^2}{|f_q| + \varepsilon_{mGR}}, \quad (51)$$

h	Punktspreizfunktion (PSF) des Mikroskops,
K_q	gemessene Bilder (hier Karten aus der NMF mit q Kanälen),
f_q	Abschätzung des Objektes O_q (Ergebnis mit q Kanälen),
$\Psi(f_q)$	Bei Entfaltung zu minimierende Funktion,
λ_{mGR}	Regularisierungsgewicht: 0,008,
ε_{mGR}	stellt Differenzierbarkeit sicher und berücksichtigt Dunkelrauschen [63]: 0,1.

Theoretisch ließe sich die Entfaltung auch direkt kanalweise auf das hyperspektrale Bild anwenden, bevor die NMF durchgeführt wird. Durch die zusätzlichen Nebenbedingungen, die während der Entfaltung helfen, Signal von Rauschen zu unterscheiden, werden jedoch nicht-lineare Manipulationen am Signal vorgenommen, die die Spektren in Abhängigkeit von räumlichen Merkmalen verändern. Es ist daher ein schlechteres Ergebnis bei einer nachfolgenden multivariaten Datenanalyse zu erwarten. Außerdem triebe die Anwendung der Entfaltung auf 512 spektrale Kanäle statt der hier gewählten 5 Komponenten den Rechenaufwand erheblich in die Höhe.

2.7. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode der LSRM wurde anhand von zwei verschiedenen Probenarten getestet. Um die Signalqualität und die Technik an sich bewerten zu können, wurden Polymerproben eingesetzt. Sie zeigen starke Raman-Streuung, sind transparent und robust. Zur Demonstration der Tauglichkeit des entwickelten LSRM für biologische Proben fanden fixierte Zebrafischembryos (*Danio rerio*) Verwendung. Sie sind beliebte Modellorganismen in der Genetik und Entwicklungsbiologie, weil sich die Embryos außerhalb des Mutterleibes entwickeln, diese lange Zeit durchsichtig bleiben und sich viele entwicklungsbiologische Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen.

2.7.1. Polymerproben

Die Polymerprobe wurde, wie oben beschrieben, aus Polystyrol-Kugeln (PS) mit $2,2 \mu\text{m}$ Durchmesser und Polymethylmethacrylat-Kugeln (PMMA) mit $6,0 \mu\text{m}$ Durchmesser auf einer glatten Fläche aus Agarose hergestellt. Wichtige spektrale Ausschnitte aus dem resultierenden hyperspektralen Bild sind in Abbildung 18 a dargestellt. Im Experiment erwiesen sich Proben dieser Art als sehr geeignet für die Justierung der Lichtschicht in all ihren Freiheitsgraden.

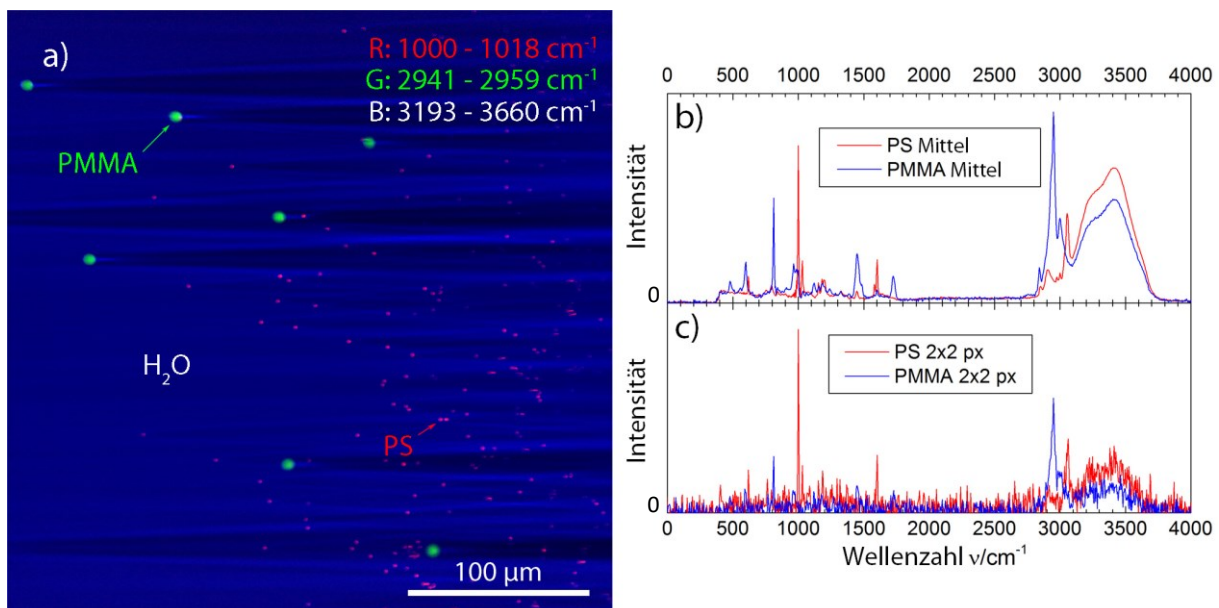


Abbildung 18: LSRM an einer Probe aus $2,2 \mu\text{m}$ PS- und $6,0 \mu\text{m}$ PMMA-Kugeln. **(a)** 2048×2048 Raman-Spektren mit 18 cm^{-1} Auflösung und einer Gesamtbelichtungszeit von $3,5 \text{ min}$: (rot) Ringatmungsmodus von PS im Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1018 cm^{-1} , (grün) C-H Streckschwingung von PMMA im Bereich zwischen 2941 cm^{-1} und 2959 cm^{-1} und (blau) Wassersignal im Bereich zwischen 3193 cm^{-1} und 3660 cm^{-1} ; **(b)** Mittel aller Spektren von PS (rot) und PMMA (blau) mit $4,4 \text{ cm}^{-1}$ spektraler Auflösung entsprechend 14 min Belichtungszeit; **(c)** einzelnes Spektrum aus einer Millionen (2×2 gebinnter) Spektren mit $4,4 \text{ cm}^{-1}$ spektraler Auflösung von PS (rot) und PMMA (blau) (modifiziert nach [25])

An der Probe wurden zwei Messungen mit jeweils verschiedener Polarisationsrichtung des Anregungslasers (577 nm, 2 W) durchgeführt. Die Bestrahlungsstärke in der Mitte der Lichtschicht betrug $1,74 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$. Eine Messung umfasst dabei 4096 Interferenzbilder für verschiedene OPDs mit jeweils 2048×2048 Pixeln. Die Belichtungszeit für ein Interferenzbild betrug 200 ms und für alle Interferenzbilder 14 min. Diese Rohdaten sind geeignet, um ein hyperspektrales Bild mit $4,4 \text{ cm}^{-1}$ spektraler Auflösung in 2048 Spektralkanälen und 375 nm lateraler Auflösung (bezogen auf ein Linienpaar) über $332,8 \text{ mm} \times 332,8 \text{ mm}$ zu erzeugen (162,5 nm pro Pixel).

Damit die erzeugte Datenmenge mit Matlab auf einem Rechner mit 128 GB Arbeitsspeicher verarbeitet werden kann, wurden diese entweder räumlich gebinnt auf 1024×1024 Pixel oder es wurden nur die mittleren 1024 Interferenzbilder verwendet, was zu einer spektralen Auflösung von 18 cm^{-1} führt und zu einer Gesamtbelichtungszeit von 3,5 min. Verglichen mit einer punktwisen Abtastung entspräche dies einer Belichtungszeit von $49 \mu\text{s}$ für ein einzelnes Spektrum. Eine solch hohe Abtastgeschwindigkeit lässt sich mit einem konfokalen Mikroskop durch Auslesezeiten und maximal mögliche Bestrahlungsstärken üblicherweise nicht erreichen (siehe Vergleich von LSRM und konfokaler Raman-Mikroskopie).

Ein wichtiges Merkmal für ein bildgebendes Spektrometer ist die örtliche Homogenität der spektralen Antwort. Das Spektrometer sollte unabhängig von der Position der Probe stets die gleichen Spektren liefern. Anders ausgedrückt: Die Mittelung über mehrere Spektren unter gleichen Bedingungen sollte nicht zu einer Verbreiterung der Spektrallinien führen. Dank der algorithmischen Winkelkorrektur im Interferometer ist zwischen den Raman-Banden bei 1001 cm^{-1} von PS in Abbildung 18 b und c kein signifikanter Unterschied in Form und Breite zu erkennen.

Die rechtwinklige Geometrie der Lichtschichtbeleuchtung erlaubt zwei qualitativ verschiedene Polarisierungen der Beleuchtung: in der Lichtschicht (0°) und orthogonal zur Lichtschicht (90°). Die Abbildung 19 zeigt die Raman-Spektren von PS und PMMA für beide Polarisationsrichtungen. Bemerkenswert ist die unterschiedliche Form der Spektren und die Dämpfung der völlig symmetrischen Ringatmungsschwingung von PS bei 1001 cm^{-1} . Da nur die Polarisation der Beleuchtung jedoch nicht die der Detektion geändert wurde, ist ein komplettes Verschwinden nicht zu erwarten [1]. In der Raman-Spektroskopie kann die Polarisationsinformation bei der chemischen Identifikation der Moden helfen. Der gitterfreie Spektrometerraufbau (Abbildung 13) hat isotrope Eigenschaften bezüglich der Polarisation.

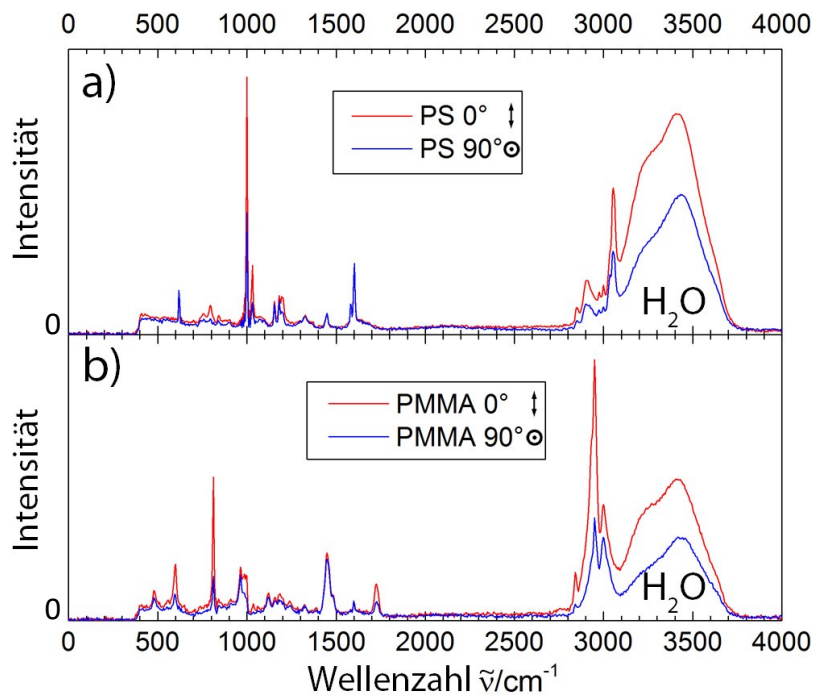


Abbildung 19: LSRM in Abhängigkeit von der Polarisierung der Beleuchtung. **(a)** PS-Kugeln und **(b)** PMMA-Kugeln beleuchtet mit der Polarisationsrichtung in der Lichtschicht 0° (rot) und orthogonal zur Lichtschicht 90° (blau) (modifiziert nach [25])

2.7.2. Volumenbildung an einem Zebrafischembryo

Die Anwendbarkeit von LSRM auf biologische Proben wird anhand eines drei Tage alten, pigmentreduzierten Zebrafischembryos, welcher mit Paraformaldehyd fixiert und mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline PBS) gewaschen wurde, demonstriert. Abbildung 17 zeigt drei Raman-Bänder aus dem 3D hyperspektralen Bild einer Ebene der Zebrafischprobe. Hier sind die Schatten in der Lichtschicht mittels Division durch das Wassersignal reduziert. Diese Methode funktioniert solange sehr gut, wie die Lichtschicht nicht zu stark aus dem Fokus gestreut wird. In der Zebrafischprobe verbleibt durch die hohe Brechungsindexänderung ein Schatten hinter der Augenlinse.

Anhand dieser Probe wurden mit dem beschriebenen LSRM (vergleiche auch Tabelle 2) in der Mitte des Sichtfeldes im Mittel 1400 Photoelektronen pro Pixel (nominell $162,5 \text{ nm} \times 162,5 \text{ nm}$) und Sekunde bei einer Gesamtlaserleistung von $P_0 = 1 \text{ W}$ gemessen (Rohdaten).

Mit Hilfe der NMF lassen sich aus den hyperspektralen Bildern des Zebrafisches ohne zusätzliches Wissen chemische Bestandteile der Probe identifizieren. Dazu wurden der Bereich von 500 cm^{-1} bis 1850 cm^{-1} und der Bereich der C-H-Streckschwingungen (2750 cm^{-1} bis 3100 cm^{-1}) der Spektren mit Hilfe der NMF in fünf Raman-Spektren zerlegt (siehe Abbildung 20).

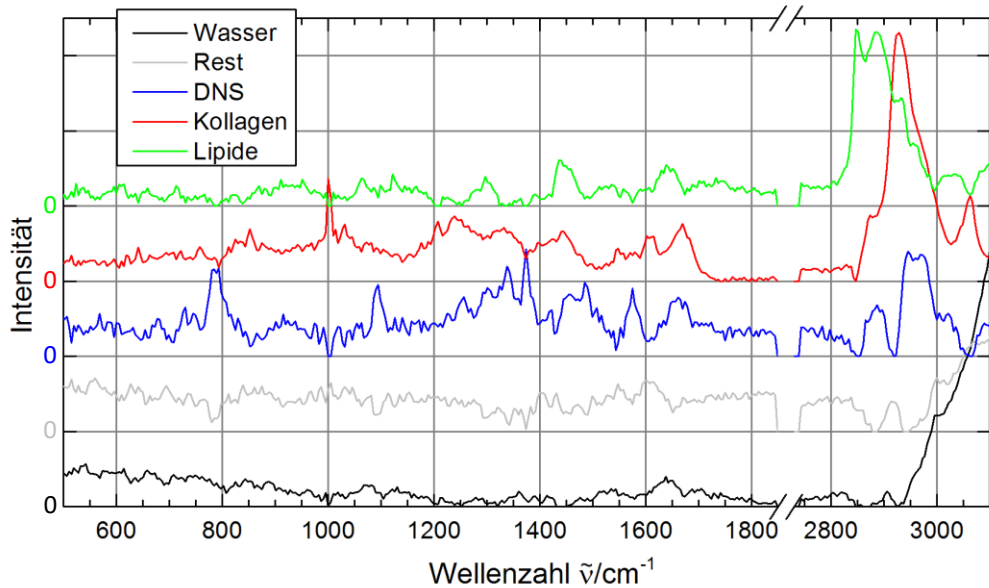


Abbildung 20: Durch NMF extrahierte Raman-Spektren des Auges eines Zebrafischembryos. Die spektrale Auflösung beträgt $4,4 \text{ cm}^{-1}$. Die Graphen zeigen das Ergebnis der multiplikativen Aktualisierungsregeln nach 250 000 Iterationen. (modifiziert nach [25])

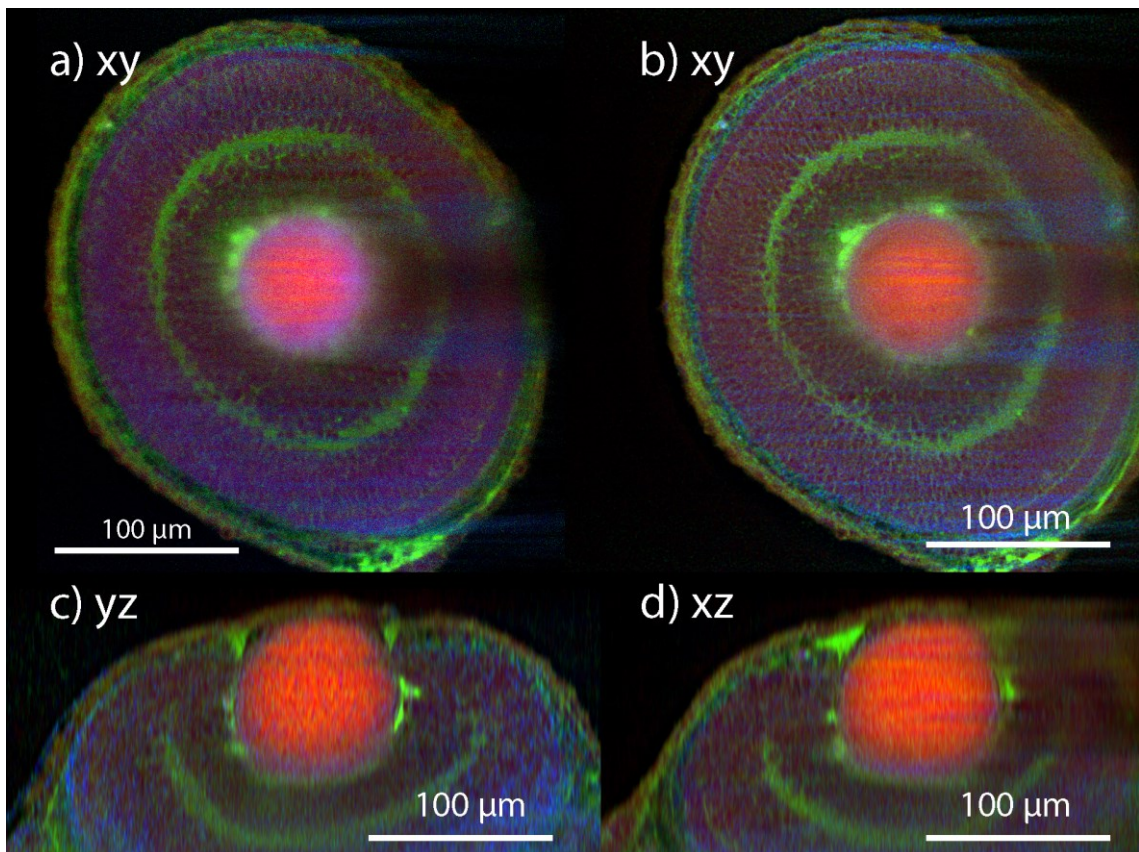


Abbildung 21: Entmischtes 3D-Raman-Bild des Auges eines Zebrafischembryos. Die einzelnen Farbkanäle korrespondieren mit den extrahierten Spektren aus Abbildung 20. Die Raman-Signatur passt zum Spektrum von: (rot) Proteinen wie Kollagen, (grün) Lipiden, (blau) Desoxyribonukleinsäure (DNS). (a) Ausgewählte xy-Ebene aus dem 3D hyperspektralen Bild mit 18 cm^{-1} spektraler Auflösung (b) wie (a) jedoch nach 3D-Entfaltung jedes Farbkanals. (c) Ausgewählte yz-Ebene (d) Ausgewählte xz-Ebene. (nach [25])

Durch den Vergleich der Spektren mit Referenzspektren [64], [65], lassen sich Proteine wie Kollagen³, Lipide⁴, Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Wasser identifizieren. Die korrespondierenden chemischen Karten sind rot (Kollagen), grün (Lipide) und blau (DNS) in Abbildung 21 a dargestellt. Die Zerlegung, welche durch die NMF anhand einer einzelnen Probenschicht mit $4,4 \text{ cm}^{-1}$ spektraler Auflösung gefunden wurde, fand, wie in Kapitel 2.6.4.1. beschrieben, auf ein gesamtes 3D hyperspektrales Bild aus 50 Ebenen mit 18 cm^{-1} spektraler Auflösung Anwendung. Die Belichtungszeit für eine einzelne Ebene betrug dabei 17 min. Nach der Separation in fünf Volumen-Grauwertbilder, wurde jedes einzelne mit einer simulierten PSF entfaltet. Drei der fünf Volumen-Grauwertbilder sind als Rot-, Grün- und Blau-Kanal in Abbildung 21 b-d dargestellt. Das Ergebnis lässt sich als chemische Konzentrationskarte von drei wichtigen Biomolekültypen interpretieren.

³ Kollagen: Strukturprotein der extrazellulären Matrix bei vielzelligen Tieren

⁴ Lipide (Fett): hauptsächlich Strukturkomponenten in Zellmembranen, Energiespeicher oder Signalmoleküle

2.8. Vergleich von LSRM und konfokaler Raman-Mikrospektroskopie

Die Leistungsfähigkeit des in dieser Arbeit entwickelten LSRMs lässt sich im Vergleich mit einem konfokalen Raman-Mikroskop mit fasergekoppeltem Gitterspektrometer (WITec $\alpha 300$), entsprechend des Standes der Technik, beurteilen (siehe auch Einführung). Mit LSRM werden 14 min benötigt um vier Millionen Raman-Spektren einer Polymerprobe mit einer Auflösung von $4,4 \text{ cm}^{-1}$ und ausreichendem SNR aufzuzeichnen. Das konfokale Mikroskop würde für die gleiche Aufgabe mit der schnellsten Abtastgeschwindigkeit hingegen 51 h benötigen. LSRM erreicht somit eine 213-fach höhere Geschwindigkeit im Vergleich zum WITec $\alpha 300$ konfokalen Raman-Mikroskop.

Diese Schlussfolgerung ist jedoch etwas übereilt, da weder die Signalqualität (SNR) noch die Bestrahlungsstärke von beiden Systemen berücksichtigt wurde. Für einen anwendungsorientierten Vergleich wurde in dieser Arbeit die kollagenreiche Augenlinse einer Zebrafischprobe verwendet (siehe Abbildung 21). Die experimentellen Parameter sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Experimentelle Parameter des entwickelten LSRMs im Vergleich zum konfokalen Raman-Mikroskop für den Methodenvergleich anhand der Augenlinse eines Zebrafischembryos.

Parameter	LSRM	Konfokales Raman-Mikroskop
Anregungswellenlänge λ	577 nm	532 nm
Laser-Leistung in der Probe	750 mW (sheet)	30 mW (spot)
Spitzenbestrahlungsstärke	$870 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$	$300 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$
Bestrahlung außerhalb des Fokus (gemittelt über eine Messung)	Gaußförmige Abnahme (Abbildung 2 rechts)	Kein Abnahme (Abbildung 2 links)
Objektiv Typ (Nikon)	40 × Wassertauchobjektiv	60 × Wassertauchobjektiv
Objektiv NA	0,8	1,0
Pixelabstand in der Probe	162,5 nm	500 nm
Anzahl Pixel	2048 × 2048	80 × 80
Sichtfeld $s \times s$	$325 \mu\text{m} \times 325 \mu\text{m}$	$40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$
Anzahl der Spektralkanäle	2048	1024
Spektrale Bandbreite in cm^{-1}	−1085 bis 8123	25 bis 3893
Spektrale Abtastung (Auflösung)	$4,4 \text{ cm}^{-1}$	$3,8 \text{ cm}^{-1}$ (Mittel)
Belichtungszeit t für das Sichtfeld	4096 s	280 s
Belichtungszeit pro Pixel	980 μs	43,71 ms
Spektrales SNR für $1 \mu\text{m}^2$ Wassersignal	15:1	42:1
SNR nach Tiefpassfilterung ($\sigma = 4,4 \text{ cm}^{-1}$)	31:1	-

Vergleicht man die Signalqualität des Wasserbandes zwischen 3200 cm^{-1} und 3500 cm^{-1} über jeweils $1\text{ }\mu\text{m}^2$ gemittelte Spektren, so scheint das konfokale Mikroskop mit Gitterspektrometer ein wesentlich besseres SNR (42:1) im Vergleich zum LSRM (15:1) zu liefern (siehe Abbildung 22). Vergleicht man die Spektren genauer, so fällt auf, dass das Gitterspektrometer weniger scharfe Peaks zeigt.

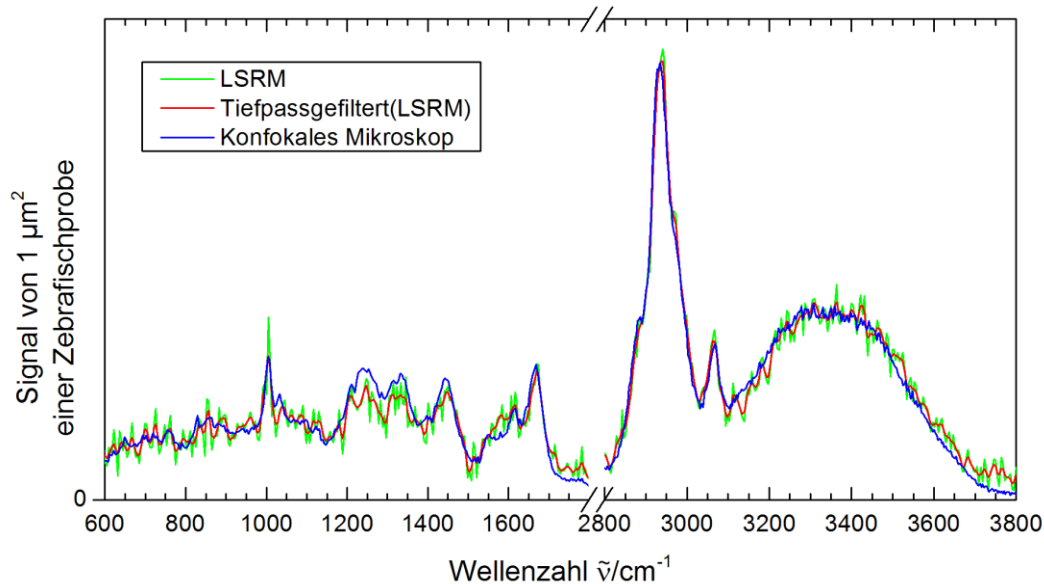


Abbildung 22: Vergleich der Signal-Rausch-Verhältnisse (SNR) des LSRMs mit dem eines dem Stand der Technik entsprechenden konfokalen Raman-Mikroskops anhand der Raman-Spektren der kollagenreichen Augenlinse einer fixierten Zebrafischprobe gemittelt über $1\text{ }\mu\text{m}^2$. **Grün:** gemittelte spektrale LSRM-Daten aus 6×6 Rohpixeln ($1\text{ }\mu\text{m} \times 1\text{ }\mu\text{m}$). Die äquivalente Belichtungszeit bezogen auf eine pixelweise Abtastung entspricht 39 ms. **Rot:** wie grün, jedoch tiefpassgefiltert mit einem Gaußfilter mit $\sigma = 4,4\text{ cm}^{-1}$. **Blau:** gemittelte spektrale Daten des konfokalen Mikroskops aus 2×2 Rohpixeln ($1\text{ }\mu\text{m} \times 1\text{ }\mu\text{m}$) mit einer Belichtungszeit von 175 ms. Vergleiche die Form des Peaks bei 1001 cm^{-1} und das Rauschen im Wasserband zwischen 3200 cm^{-1} und 3500 cm^{-1} . (modifiziert nach [25])

Die spektrale Auflösung eines Gitterspektrometers wird nicht nur von der Pixelgröße des Detektors sondern auch von der Anzahl der beleuchteten Linienpaare des Gitters, der Größe des Eintrittsspalt und den Aberrationen im Spektrometer begrenzt. Die Peak-Antwort eines Gitterspektrometers auf eine monochromatische Quelle wird durch die Form des Eintrittsspalt (hier das Ende der Glasfaser) und die Ausleuchtungsfunktion des Gitters bestimmt [66], [67]. Die Fourier-Transformierte der Peak-Antwort kann als Übertragungsfunktion des Spektrometers betrachtet werden. Ein sinnvoller Vergleich der Qualität der Spektren muss demnach frequenzabhängig erfolgen. Der Begriff Frequenz bezieht sich diesem Zusammenhang auf den Amplitudenverlauf des Spektrums und meint nicht die Lichtfrequenz. Alternativ kann das Frequenzverhalten bzw. die Peak-Antwort der Spektrometer nach der Messung aneinander angepasst werden. Dabei wird auch das Rauschen frequenzabhängig mitverändert.

Für eine einfache Bewertung wird hier der zweite Weg gegangen. Dazu wird das Spektrum des LSRMs so tiefpassgefiltert, dass die Form der Peaks denen des konfokalen Mikroskops gleicht. Es wird ein Gaußfilter mit einer Standardabweichung von $\sigma = 4,4 \text{ cm}^{-1}$ verwendet. Damit ergibt sich für das LSRM ein SNR von (31:1).

Tatsächlich ist der SNR-Vergleich der beiden Methoden generell nicht einfach, da das Fourier-Transformations-Spektrometer des LSRM zu gaußförmigem Rauschen führt, dessen Standardabweichung vom mittleren Signal in jedem Spektrum abhängt. Das Gitterspektrometer zeigt hingegen im Wesentlichen poissonverteiltes Rauschen für jedes einzelne hyperspektrale Voxel [68], [69] (vergleiche auch mit Kapitel 3.2.).

Für die Abschätzung des Geschwindigkeitsvorteils durch LSRM im Vergleich zur konfokalen Technik anhand der Zebrafischprobe müssen alle experimentellen Bedingungen berücksichtigt werden. Unter Vernachlässigung der Effizienz der optischen Komponenten und des Interferenzkontrastes im Interferometer erhält man mit angeglichenen experimentellen Gegebenheiten ein Geschwindigkeitsverhältnis gv aus den Gesamtbelichtungszeiten \hat{t}_L und \hat{t}_K . Der Subindex L bezeichnet dabei das LSRM und der Subindex K das konfokale Mikroskop.

$$gv = \left[\frac{\hat{t}_L}{\hat{t}_K} \right]^{-1} = \left[\frac{\lambda_L}{\lambda_K} \right]^4 \cdot \left[\frac{NA_L}{NA_K} \right]^{-2} \cdot \left[\frac{s_L}{s_K} \right]^2 \cdot \left[\frac{SNR_L}{SNR_K} \right]^2 \cdot \left[\frac{t_L}{t_K} \right]^{-1} \quad (52)$$

$$gv = \left[\frac{577 \text{ nm}}{532 \text{ nm}} \right]^4 \cdot \left[\frac{0,8}{1} \right]^{-2} \cdot \left[\frac{325 \text{ }\mu\text{m}}{40 \text{ }\mu\text{m}} \right]^2 \cdot \left[\frac{31}{42} \right]^2 \cdot \left[\frac{4096 \text{ s}}{280 \text{ s}} \right]^{-1} = 5,3 \quad (53)$$

Es werden Unterschiede im Raman-Streuquerschnitt zwischen den beiden Anregungswellenlängen λ sowie Unterschiede in der numerischen Apertur NA der beiden Systeme berücksichtigt. Außerdem wird das Sichtfeld ($s \times s$) jeweils auf die gleiche Größe normiert und es werden die Unterschiede im SNR für eine Fläche von $1 \text{ }\mu\text{m}^2$ einbezogen. Das Geschwindigkeitsverhältnis gv kann dabei nicht als generelle Bewertung beider Techniken angesehen werden, da es stark von den experimentellen Bedingungen und Anforderungen abhängt. Zum Beispiel verhält sich gv proportional zum Sichtfeld, da t_L unabhängig von s_L ist, wohingegen t_K linear mit s_K skaliert. Die Wahl der Anregungswellenlänge für den Raman-Prozess hängt stark von der Absorbanz und der Fluoreszenz der Probe ab. Für den Vergleich wurde die Fluoreszenz in beiden Fällen zuvor geblichen während die Absorbanz bei beiden Wellenlängen als gleich angenommen wurde.

Während die Geschwindigkeit durch die Lichtschichtbeleuchtung erhöht wird, sinkt gleichzeitig die benötigte Bestrahlungsstärke um den Faktor 340 im Vergleich zum punktwisen Abtasten (Tabelle 4). Auch mit zeilenweise abtastenden Systemen ist bei gleicher Geschwindigkeit keine so starke Reduktion der maximalen lokalen Helligkeit möglich [16]. Wenn für die Mikroskopie von biologischen Proben generell die Bestrahlungsstärke auf $2 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$

beschränkt wäre, so wie dies in [16] angenommen wird, dann könnten Messungen bei gleicher Signalqualität durch LSRM 780-fach im Vergleich zu konfokalen Mikroskopen beschleunigt werden.

2.9. Diskussion

Lichtschicht-Raman-Mikrospektroskopie (LSRM) ist eine neue, in dieser Arbeit entwickelte Methode um große hyperspektrale Raman-Bilder von biologischen Proben aufzunehmen. Sie ist für eine $325 \mu\text{m} \times 325 \mu\text{m}$ große Probe 5,3-mal schneller als konventionelle konfokale Raman-Mikrospektroskopie, wobei durch die Lichtschichtbeleuchtung gleichzeitig die Bestrahlungsstärke in der Probe um den Faktor 340 reduziert werden kann. Ein weiterer Vorteil der Lichtschichtbeleuchtung besteht in der Trennung von Beleuchtungs- und Detektionsoptik, wodurch Hintergrundsignale von Linsen und Objektträger reduziert werden.

Für die erfolgreiche experimentelle Realisierung der LSRM-Technik wurden in dieser Arbeit ein stabiles, bildgebendes Fourier-Transformations-Spektrometer für große Sichtfelder, eine robuste Technik zur Probeneinbettung in Wasserimmersion und eine zuverlässige Methode zur Schattenreduktion in der Lichtschicht anhand des Wassersignals entwickelt. Das Spektrometer basiert auf einem neu entwickelten, an ein Mach-Zehnder-Interferometer angelehnten Aufbau mit Retroreflektoren, dessen optische Pfadlängendifferenz mit einer elektronischen Regelschleife anhand eines Helium-Neon-Referenzlasers stabilisiert ist. Während der Bilddatenverarbeitung werden das Driften der Probe, die spektrale Phase, der Zerfall des Fluoreszenzsignals und der Einfluss großer Winkel im Interferometer korrigiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die gewonnenen hyperspektralen Bilder für eine multivariate Datenanalyse wie die nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF) eignen und sich räumliche Kontraste im Ergebnis durch Entfaltung verbessern lassen.

Wie bei anderen Lichtschichttechniken muss für eine ausreichende Eindringtiefe die zu untersuchende Probe auch für die LSRM entsprechend durchsichtig sein. Zebrafischembryos sind daher häufig verwendete biologische Proben in der Lichtschichtmikroskopie. Die Bildqualität kann durch Rayleigh-Streuung der Lichtschicht oder durch erneute Streuung des Raman gestreuten Lichtes abnehmen. Die erreichbare Eindringtiefe wird, genau wie in der LRFM, durch Inhomogenitäten in der Probe wie Fettzellen oder hier der Augenlinse des Zebrafisches begrenzt. Betrachtet man den gesamten aufgenommenen Datensatz aus 50 Schichten des Zebrafischauges genauer, so erkennt man auf der letzten Schicht, in $150 \mu\text{m}$ Tiefe, eine Abnahme der Bildqualität.

Tatsächlich ist es möglich, auch undurchsichtige biologische Zellen und Gewebe durch optisches Klären (optical clearing) künstlich durchsichtig zu machen [70]. Um Streuung zu reduzieren, muss der Brechungsindex der Probe homogenisiert werden. Viele Methoden entfer-

nen dazu die Lipide, die interessanten chemischen Raman-Kontrast zeigen oder nutzen organische Lösungsmittel, die selbst ein starkes Raman-Signal zeigen und damit das Signal aller anderen Moleküle überdecken. Alles in allem stellt optisches Klären einen starken chemischen Eingriff in die Probe dar und macht damit den Vorteil von Raman- gegenüber Fluoreszenz-Mikroskopie, labelfrei und nichtinvasiv zu sein, wieder zunichte.

Zur Präparation der Probe gehört die Wahl eines geeigneten Einbettungsmediums. Dieses sollte ein deutlich von der Probe abweichendes Raman-Signal liefern und die Probe über einen langen Zeitraum starr halten. Ein weit verbreitetes Einbettungsmedium für die LSFM ist Agarose. Für die Entwicklungsbiologie werden auf diese Weise sogar lebende Organismen über mehrere Tage eingebettet [20]. Es eignet sich auch für LSRM, neigt jedoch in der Gegenwart von stark absorbierenden Proben zum Schmelzen. Zurzeit werden viele Ansätze zur Verbesserung von Klärungs- und Einbettungsmethoden erforscht [70].

Die LSRM könnte in verschiedener Weise weiterentwickelt werden. So ließen sich viele Techniken zur Erzeugung der Lichtschicht, die in den letzten Jahren für die LSFM entwickelt wurden auch in der LSRM anwenden. Ein Beispiel ist die Gitter-Lichtschicht-Beleuchtung (lattice light sheet) [71], welche eine verbesserte Tiefenauflösung mit sich brächte. Alternativ könnte zur Erzeugung der Lichtschicht eine linienweise Gauß-Bessel-Beleuchtung verwendet werden, zu der ein Abtastspalt synchronisiert ist, um den Kontrast und die Konfokalität zu erhöhen [72]. Diese Beleuchtungsgeometrie könnte mit einem spaltweise abtastenden bildgebenden Spektrometer kombiniert werden. Um die beleuchtungsbedingten Schatteneffekte in der Probe weiter zu reduzieren könnte diese aus mehreren Richtungen gleichzeitig, nacheinander oder mit einer pivotierten Lichtschicht beleuchtet werden [73]. Auch Techniken der strukturierten Beleuchtung könnten in der Raman-Mikrospektroskopie verwendet werden [74], um die räumliche Auflösung über die Abbe-Grenze hinaus zu erhöhen. Abhängig von der Anwendung könnte es sinnvoll sein eine andere Wellenlänge zur Anregung zu verwenden, um Absorption und eventuelle Autofluoreszenz zu reduzieren oder den Raman-Streuquerschnitt zu vergrößern. Für biomedizinische Anwendungen hat sich aufgrund der hohen Eindringtiefe und der geringen Fluoreszenz eine Standardwellenlänge zur Anregung der Raman-Streuung von 785 nm etabliert.

Die Bilddatenverarbeitung des bildgebenden Fourier-Transformations-Spektrometers setzt idealerweise eine starre Probe während der gesamten Messung voraus. Eine globale Drift wird bereits während der Bilddatenverarbeitung korrigiert. Zusätzlich könnte auch eine langsame Verformung der Probe korrigiert werden. Eine beliebige dreidimensionale Bewegung der Probe während der Belichtung einer einzelnen Schicht (hier über 17 min) lässt sich jedoch nur schwer kompensieren und wird in der Regel begleitet durch räumliche Reduktion der Auflösung und Verbreiterung von Spektrallinien.

Durch effizientere Detektion kann die Geschwindigkeit von LSRM weiter gesteigert werden. Der bisher ungenutzte zweite Ausgang am Interferometer kann verwendet werden, um das Signal zu verdoppeln und um zeitabhängige Fluktuationen in der Laserintensität zu korrigieren. Auch lohnt es sich andere bildgebende, hyperspektrale Techniken in Betracht zu ziehen, die bessere SNR-Eigenschaften und damit kürzere Messzeiten versprechen, auch wenn praktisch Kompromisse bei der Größe des Sichtfeldes gemacht werden müssen [68], [75]–[77]. Im dritten Kapitel dieser Arbeit werden ausführlich verschiedene Kombinationen aus bildgebenden Spektrometern und Beleuchtungsgeometrien vor dem Hintergrund der erreichbaren Signalqualität in der Mikrospektroskopie diskutiert.

Auch wenn LSRM keine hyperspektralen Raman-Bilder mit Videorate ermöglicht, was vor dem Hintergrund von Fluoreszenztechniken sehr wünschenswert wäre, so bietet sie doch gegenüber konfokalen Techniken den wesentlichen Vorteil der prinzipiellen Unabhängigkeit der Messzeit von der Größe des Sichtfeldes. Dies ermöglicht die gleichzeitige Raman-Mikrospektroskopie an vielen verschiedenen Zellen und erlaubt somit verbesserte Einblicke in die chemische Beschaffenheit von heterogenen Organen.

3. Signal- und Geschwindigkeitsgrenzen in der Mikrospektroskopie

Im vorangegangenen Teil der Arbeit wurde eine neue Methode der Lichtschicht-Raman-Mikrospektroskopie entwickelt, welche fortan als LSRM bezeichnet wird. Der technische Geschwindigkeitsgewinn gegenüber einem kommerziellen konfokalen System entsprechend des Standes der Technik konnte mit dem Faktor 213 angegeben werden. Der Geschwindigkeitsgewinn bei gleicher Signalqualität lag immerhin noch bei einem Faktor 5,3.

In der Literatur [14]–[16] und auf dem Markt der kommerziellen Raman-Mikrospektrometer [78] werden linienabtastende konfokale Mikroskope beworben, deren Geschwindigkeitsvorteile aus der Parallelisierung sich um Faktoren von 100 bewegen sollen.

Geschwindigkeitsvergleiche müssen immer unter bestimmten und gleichen Voraussetzungen durchgeführt werden, die sehr entscheidend für das Vergleichsergebnis und seinen Nutzen bei der Wahl des richtigen Mikrospektrometers für die eigenen Messaufgaben sind.

In diesem Teil der Arbeit werden solche gemeinsamen Merkmale von Mikrospektrometern genau untersucht, die einen aussagefähigen Vergleich bezüglich ihrer zu erwartenden Arbeitsgeschwindigkeiten für bestimmte Aufgabenstellungen ermöglichen. Darauf basierend werden das konfokale, das linienkonfokale, das Weitfeld-, das Lichtschicht-Raman-Mikroskop und ein Mikroskop mit einer Lichtlinienbeleuchtung für die Vermessung biologischer Proben verglichen. Es wird sich zeigen, dass sich der Grad der Parallelisierung des Messverfahrens vorteilhaft auf dessen Geschwindigkeit auswirken kann, solange die Abtastgeschwindigkeit aus technischen Gründen begrenzt ist. Stößt jedoch die thermische Belastbarkeit der Probe durch deren Beleuchtung an Grenzen, wie es besonders bei biologischen Proben der Fall ist, gehen die Vorteile aus der Parallelisierung teilweise verloren und die Arbeitsgeschwindigkeiten aller Verfahren nähern sich wieder einander an.

Im Allgemeinen besteht ein Mikrospektrometer aus einer Lichtquelle, einer Beleuchtungsoptik, der Probe, einer Detektionsoptik, einem Spektrometer, einem Detektor und einem Verfahren zur sequentiellen Abtastung und Bildgebung (siehe Abbildung 23).

Mikrospektrometer besitzen drei für den Geschwindigkeitsvergleich entscheidende Merkmale:

1. die örtliche Codierung der Probe,
2. die spektrale Codierung des Streulichts und
3. die Belastung der Probe durch die Messung.

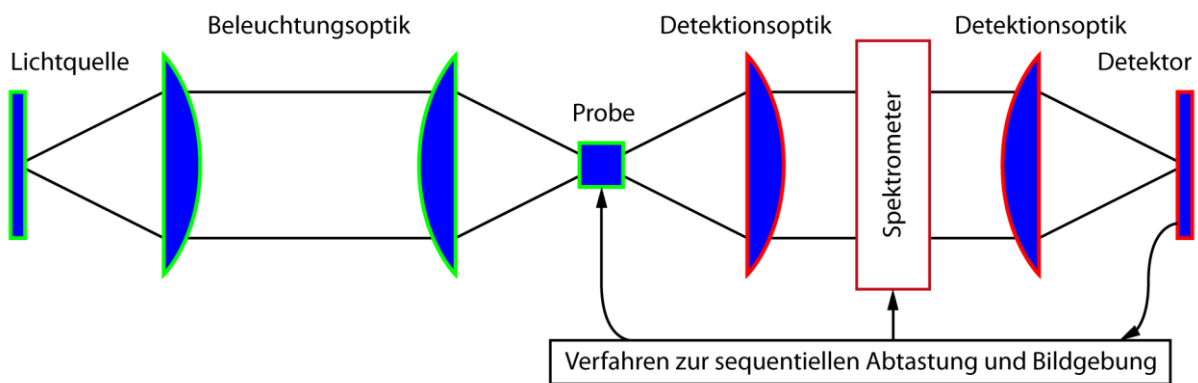


Abbildung 23: Symbolische Darstellung eines allgemeinen Mikrospektrometers. Bei den Bestandteilen handelt es sich um logische Komponenten, die für ein bestimmtes Mikrospektrometer physikalisch miteinander verbunden sein können.

Anhand dieser Merkmale lassen sich die Komponenten eines Mikrospektrometers in Gruppen zusammenfassen, welche nicht notwendigerweise disjunkt sind, sich aber getrennt voneinander betrachten lassen.

Die erste Gruppe besteht aus all den Komponenten, die für die örtliche Codierung der Probe zuständig sind. Es handelt sich dabei um die Komponenten eines allgemeinen Mikroskops [79] (siehe Abbildung 23, blaue Komponenten). In Kapitel 3.1. wird unabhängig von der spektralen Lichtzusammensetzung die Erzeugung des Signals am Detektor anhand eines allgemeinen Mikroskops vor dem Hintergrund der Raman-Streuung und Fluoreszenz diskutiert.

Die zweite Gruppe fasst alle Komponenten zusammen, die für die spektrale Codierung des von der Probe gestreuten Lichtes zuständig sind. Dies betrifft zunächst das Spektrometer, welches jedoch seinerseits untrennbar mit Eigenschaften der Abbildungsoptik und dem Detektor verbunden ist (siehe Abbildung 23, rot). In Kapitel 3.2. werden verschiedene Klassen von bildgebenden Spektrometern und deren Eigenschaften bezüglich der Signalqualität (SNR) diskutiert.

Bevor die dritte Gruppe benannt werden kann, muss der begrenzende Zerstörmechanismus der Probe gefunden werden. In Kapitel 3.3. wird dieser für biologische Volumenproben mit der thermischen Belastung identifiziert.

Diese dritte Gruppe schließlich besteht aus allen Komponenten, welche die Wärmeleitungsgeometrie vorgeben. Sie besteht aus der Probe und der Beleuchtungsgeometrie, wobei letztere durch die Lichtquelle und die Beleuchtungsoptik gegeben ist (siehe Abbildung 23, grün und Kapitel 3.4.).

In Kapitel 3.5. werden die Ergebnisse aus den drei Gruppen genutzt, um daraus die erreichbare Signalqualität für verschiedene Mikrospektrometer bei einer vorgegebenen totalen Messzeit zu errechnen.

3.1. Signalerzeugung in einem allgemeinen Mikroskop

Um die Signalausbeute beliebiger Mikroskope miteinander vergleichen zu können, wird in diesem Abschnitt ein Maß für das in einem bestimmten Mikroskop detektierbare Licht gefunden. Ein allgemeines Mikroskop [79] besteht aus einer Lichtquelle, einer Beleuchtungsoptik, der Probe, einer Detektionsoptik und einem Detektor (siehe Abbildung 24). Die Beleuchtungs- und Detektionsoptik müssen physikalisch nicht auf einer gemeinsamen optischen Ache liegen, sondern können in der Probe auch in einem Winkel zueinander stehen um neben Durchlicht- auch Dunkelfeld- und Reflexionsgeometrien zu ermöglichen.

Entscheidend für die Herangehensweise bei der mathematischen Beschreibung eines Mikroskops sind die Eigenschaften der kontrastgebenden Wechselwirkung des Lichts mit der Probe. Häufig wird dabei in fluoreszierende und nichtfluoreszierende Proben unterschieden [80].

Nichtfluoreszierende Proben können Licht absorbieren oder dessen Phase beeinflussen. Solche Proben werden durch ihre lokale, komplexe Reflektivität oder Transparenz beschrieben. Entscheidend dabei ist das Vorhandensein eines deterministischen Zusammenhanges zwischen der Phase des beleuchtenden und des transmittierten bzw. des elastisch gestreuten Lichtes. Dieser erfordert in der Bildgebung die Betrachtung der elektrischen Feldamplitude. Man spricht auch von kohärenter Bildgebung. Die Eigenschaften eines abbildenden Systems werden mit der Kohärenzspeizfunktion (Coherent Spread Function, CSF) beschrieben [80].

Fluoreszierende Proben absorbieren Licht und emittieren einen Teil dieser Energie Stokes verschoben mit einer längeren Wellenlänge. Bei diesem Prozess geht die Phaseninformation des anregenden Lichtes verloren. Proben können daher als inkohärente, selbstleuchtende Quellen betrachtet werden. Statt der elektrischen Feldamplitude wird deren Quadrat, die Intensität betrachtet. Die Eigenschaften eines abbildenden Systems werden mit der Punktspreizfunktion (Point Spread Function, PSF) beschrieben [80].

Spontane Raman-Streuung ist ein Prozess bei dem elektromagnetische Wellen unelastisch an einem Festkörper streuen und Energie mit den mechanischen Schwingungsfreiheitsgraden austauschen. Da die Phase des Raman-Signals sowohl von der Phase der eingestrahlten elektromagnetischen Welle als auch von der Phase der molekularen, mechanischen Schwingung abhängt und letztere als zufällig angesehen werden kann, ist auch die Phase des Raman-Signals zufällig. Spontan Raman gestreutes Licht kann demnach, genau wie Fluoreszenzlicht, als inkohärent betrachtet werden (vergleiche auch [4]). Die Eigenschaften eines abbildenden Systems werden wieder mit der PSF beschrieben.

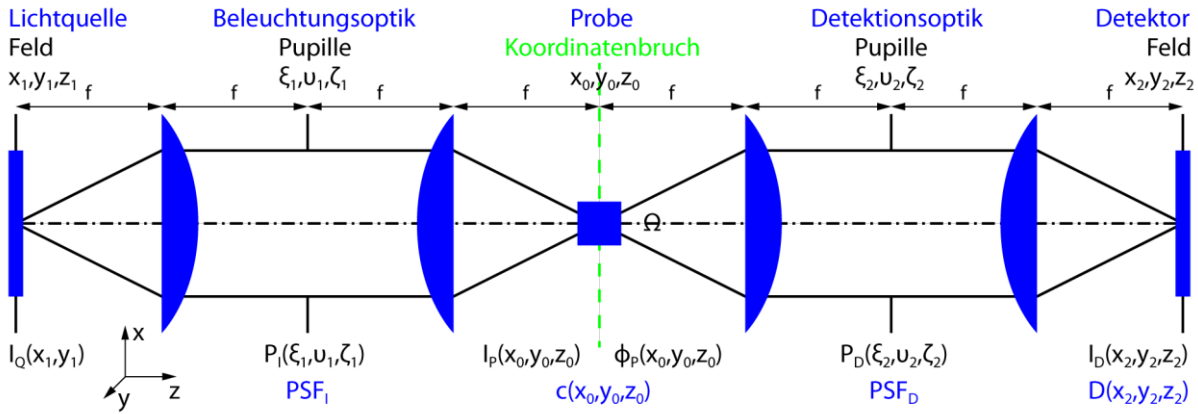


Abbildung 24: Optisches System eines verallgemeinerten Mikroskops. Die Beleuchtung und Detektion können am Koordinatenbruch in einem Winkel zueinander stehen, um neben Durchlicht- auch Dunkel-feld- und Reflexionsgeometrien zu ermöglichen. Da eine Vergrößerung nur eine zusätzliche Koordina-tentransformation erfordert, wird diese hier der Einfachheit halber auf eins festgelegt.

3.1.1. Das Signal am Detektor

Das am Detektor eines Mikroskops gemessene Signal J ist gegeben durch das Produkt aus Lichtintensität am Detektor $I_D(x_2, y_2, z_2)$ und örtlicher Empfindlichkeitsfunktion des Detek-tors $D(x_2, y_2, z_2)$:

$$J = \iiint D(x_2, y_2, z_2) \cdot I_D(x_2, y_2, z_2) dx_2 dy_2 dz_2 . \quad (54)$$

Ein realer, ausgedehnter Detektor (ein Pixel einer Kamera oder das Pinhole vor einer Photo-diode) hat dabei eine 2D-Detektorempfindlichkeitsfunktion $D(x_2, y_2)$ die überall kleiner gleich 1 ist:

$$D(x_2, y_2, z_2) = D(x_2, y_2) \delta(z_2) . \quad (55)$$

Ein unendlich kleiner Detektor bzw. ein Detektor hinter einem unendlich kleinen Pinhole führt so zu einer Null-Leistung. Idealisiert man hingegen den Detektor als eine Deltafunktion, so wird die Detektionseffizienz in der Mitte unendlich:

$$D(x_2, y_2, z_2) = \delta(x_2) \delta(y_2) \delta(z_2) . \quad (56)$$

Dadurch erhält die Empfindlichkeitsfunktion $D(x_2, y_2, z_2)$ die Einheit m^{-3} und man erhält für das gemessene Signal J statt einer Leistung (W) die Intensität (Wm^{-2}) an einem Punkt x_2, y_2, z_2 .

3.1.2. Abbildung mit der Detektionsoptik

Die Lichtintensität am Detektor $I_D(x_2, y_2, z_2)$ ergibt sich aus einer Faltung der Emissionsleistungsdichte der Raman-Streuung der Probe $\phi_P(x_0, y_0, z_0)$ mit der Punktspizfunktion der Detektionsoptik $PSF_D(x, y, z)$:

$$I_D(x_2, y_2, z_2) = \iiint \phi_P(x_0, y_0, z_0) \cdot PSF_D(x_2 - x_0, y_2 - y_0, z_2 - z_0) dx_0 dy_0 dz_0 . \quad (57)$$

Die Punktspizfunktion beschreibt allgemein die Antwort eines abbildenden Systems auf eine ideale, punktförmige Lichtquelle. Die Fouriertransformierte der PSF heißt optische Transferfunktion (OTF). Diese ergibt sich aus der Autokorrelation der Kohärenz Transferfunktion (CTF), welche sich im Wesentlichen mit der skalierten Pupillenfunktion P_D identifizieren lässt. Das Faltungsintegral (57) setzt dabei voraus, dass die Probe räumlich inkohärentes Licht emittiert und sich somit Intensitäten addieren. Die PSF ist so definiert, dass sie die folgende Eigenschaft besitzt [80]:

$$\iint PSF(x, y, 0) dx dy = 1 . \quad (58)$$

Die Einheit der PSF ist damit m^{-2} . In paraxialer Fraunhofer-Näherung gilt für jede Position z :

$$\iint PSF(x, y, z) dx dy = 1 \quad \text{bzw.} : \quad (59)$$

$$\int_{z'}^{z'+\Delta z} \iint PSF(x, y, z) dx dy dz = \Delta z . \quad (60)$$

3.1.3. Raman-Streuung der Probe

Die Raman-Streuung der Probe führt zu einer Emissionsleistungsdichte $\phi_P(x_0, y_0, z_0)$ mit der Einheit $W \cdot l^{-1}$. Diese ist anhand einer dreidimensionalen Verteilung von Emittlern von Strahlungsleistung in einem durchsichtigen Volumen zu verstehen. Sie ergibt sich aus der Bestrahlungsstärke $I_P(x_0, y_0, z_0)$ und den Eigenschaften der Probe wie folgt:

$$\phi_P(x_0, y_0, z_0) = I_P(x_0, y_0, z_0) \cdot \sigma_R \cdot N_A \cdot c(x_0, y_0, z_0) . \quad (61)$$

Für eine reine Wasserprobe [3] ergeben sich für typische Intensitäten des in Kapitel 2 entwickelten LSRMs folgende Parameter:

$I_P(x_0, y_0, z_0)$	Intensität der Anregung (LSRM):	$870 \mu W \cdot \mu m^{-2}$,
σ_R	Raman-Streuquerschnitt (für ein Molekül):	$7,5 \cdot 10^{-30} cm^2$,
N_A	Avogadrokonstante:	$6,022 \cdot 10^{23} mol^{-1}$,
$c(x_0, y_0, z_0)$	Konzentration der Raman-Streuer:	$55,6 mol \cdot l^{-1}$,
$\phi_P(x_0, y_0, z_0)$	Emissionsleistungsdichte:	$22 W \cdot l^{-1}$.

Eine exponentielle Intensitätsabnahme beim Durchdringen einer Probe gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz kann hier aufgrund der geringen Streu- und Absorptionsquerschnitte vernachlässigt werden (vergleiche auch Kapitel 3.3.).

Der Streuquerschnitt σ_R des einzelnen Moleküls lässt sich aus dem differentiellen Streuquerschnitt für einen bestimmten Raumwinkel Ω berechnen:

$$\sigma_R = \iint_{\Omega} \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega. \quad (62)$$

Der Raumwinkel mit dem ein Mikroskopobjektiv Licht akkumulieren kann, ergibt sich aus der numerischen Apertur zu:

$$\Omega = 2\pi \left(1 - \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n}\right)^2} \right). \quad (63)$$

Für ein einzelnes Wassermolekül im LSRM aus Kapitel 2 ergeben sich damit folgende Werte:

NA	numerische Apertur des Objektivs:	0,8,
n	Brechungsindex der Probe und des umgebenden Mediums:	1,333,
Ω	Raumwinkel in dem Signal detektiert wird:	1,26 sr,
$\frac{d\sigma}{d\Omega}$	differentieller Streuquerschnitt für ein Molekül bei 500 nm:	$6 \cdot 10^{-30} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$ [3],
σ_R	Raman-Streuquerschnitt für ein Molekül:	$7,5 \cdot 10^{-30} \text{ cm}^2$.

Die abgestrahlte Leistung eines Dipolstrahlers kann senkrecht zum Dipolmoment und vor dem Hintergrund eines Integrals über eine hohe numerische Apertur in guter Näherung als isotrop betrachtet werden. Daher wird die allgemeine Abhängigkeit des Raman-Streuquerschnittes von der Richtung und der Polarisation des Anregungslichtes vernachlässigt. Das Integral für den Raman-Streuquerschnitt (62) wird zum einfachen Produkt:

$$\sigma_R = \frac{d\sigma}{d\Omega} \cdot \Omega. \quad (64)$$

3.1.4. Die Beleuchtung der Probe

Die Bestrahlungsstärke $I_P(x_0, y_0, z_0)$ der Probe lässt sich als Abbildung einer räumlich inkohärenten Lichtquelle mit der Ausstrahlung $I_Q(x_1, y_1)$ ausdrücken:

$$I_P(x_0, y_0, z_0) = \iint I_Q(x_1, y_1) \cdot PSF_I(x_0 - x_1, y_0 - y_1, z_0) dx_1 dy_1. \quad (65)$$

Die PSF_I der Beleuchtungsoptik wird dabei im Wesentlichen durch die Pupillenfunktion P_I bestimmt. Für eine punktförmige Lichtquelle mit der Gesamtleistung P_Q gilt:

$$I_P(x_0, y_0, z_0) = P_Q \cdot PSF_I(x_0, y_0, z_0). \quad (66)$$

3.1.5. Abbildung mit dem ganzen Mikroskop

Bis jetzt entsteht das Signal J nur für ein einziges Teilvolumen der Probe. Die Entstehung eines ganzen Bildes $J(x_s, y_s, z_s)$ erfordert einen Abtastprozess. Dieser lässt sich für die Weitfeld- und Lichtschichtmikroskopie als pixelweise Verschiebung der Empfindlichkeitsfunktion des Detektors $D(x_2, y_2, z_2)$ vor dem Hintergrund einer inkohärenten Lichtquelle und für die Laser-Scanning-Mikroskopie als pixelweise Verschiebung der Lichtquelle $I_Q(x_1, y_1)$ vor dem Hintergrund einer inkohärenten Detektion verstehen (Type 1 Abtastung [79]). In der Konfokalmikroskopie werden Lichtquelle und Detektor synchron verschoben (Type 2 Abtastung [79]). Mathematisch äquivalent lassen sich all diese Abtastprozesse als eine Verschiebung der Probe $c(x_0, y_0, z_0)$ um den Ortsvektor (x_s, y_s, z_s) betrachten. Aus den vorangegangenen Überlegungen (Kapitel 3.1.1. – 3.1.4.) lässt sich die Leistung des detektierten Signals $J(x_s, y_s, z_s)$ für den Fall der Transmission schreiben als:

$$J(x_s, y_s, z_s) = \iiint D(x_2, y_2, z_2) \delta(z_2) \cdot \iiint I_P(x_0, y_0, z_0) \cdot \sigma_R \cdot N_A \cdot c(x_0 - x_s, y_0 - y_s, z_0 - z_s) \cdot PSF_D(x_2 - x_0, y_2 - y_0, z_2 - z_0) dx_0 dy_0 dz_0 dx_2 dy_2 dz_2. \quad (67)$$

Im Falle der Reflexion wird die Detektions- PSF gespiegelt: $PSF_D(x, y, z) \rightarrow PSF_D(x, y, -z)$. Bei idealer Bildgebung mit reeller und symmetrischer Apertur sind beide Geometrien äquivalent. In kompakter Ortsvektorschreibweise $\vec{r} = (x, y, z)$ gilt:

$$J(\vec{r}_s) = \sigma_R \cdot N_A \cdot \iiint \iiint D(x_2, y_2, z_2) \delta(z_2) \cdot I_P(\vec{r}_0) \cdot c(\vec{r}_0 - \vec{r}_s) \cdot PSF_D(\vec{r}_2 - \vec{r}_0) d\vec{r}_0 d\vec{r}_2. \quad (68)$$

Dieser Ausdruck aus mehreren verschachtelten Faltungsintegralen lässt sich schrittweise umformen, mit dem Faltungsoperator \otimes schreiben als:

$$J(\vec{r}_s) = \sigma_R \cdot N_A \cdot \iiint I_P(\vec{r}_0) \cdot c(\vec{r}_0 - \vec{r}_s) \cdot \iiint D(x_2, y_2, z_2) \delta(z_2) \cdot PSF_D(\vec{r}_2 - \vec{r}_0) d\vec{r}_2 d\vec{r}_0, \quad (69)$$

$$J(\vec{r}_s) = \sigma_R \cdot N_A \cdot \iiint c(\vec{r}_0 - \vec{r}_s) \cdot I_P(\vec{r}_0) \cdot (D \otimes PSF_D')(\vec{r}_0) d\vec{r}_0$$

$$\text{mit: } PSF_D'(\vec{r}) := PSF_D(-\vec{r}) \quad (70)$$

und in eine übersichtlichere Form bringen:

$$J(\vec{r}_s) = \sigma_R \cdot N_A \cdot [I_P \cdot (D \otimes PSF_D')] \otimes c'(\vec{r}_s)$$

$$\text{mit: } c'(\vec{r}) := c(-\vec{r}). \quad (71)$$

Zusammen mit Gleichung (65) lässt sich schreiben:

$$J(\vec{r}_s) = \sigma_R \cdot N_A \cdot [(I_Q \otimes PSF_I) \cdot (D \otimes PSF_D')] \otimes c'(\vec{r}_s). \quad (72)$$

Nimmt man die Detektions-*PSF* für die Reflexionsgeometrie als symmetrisch entlang der z-Achse und für die Transmissionsgeometrie zusätzlich als symmetrisch entlang der xy-Ebene an, so gilt: $PSF'_D = PSF_D$.

Das Ergebnis ist eine Abbildungsfunktion des allgemeinen Mikroskops (siehe (71), grün), die durch Faltung mit der Probe $c'(\vec{r})$ die Entstehung des Bildes $J(\vec{r}_S)$ beschreibt. Durch die Wahl der charakterisierenden Beleuchtungsverteilung I_P , die *PSF* der Detektionsoptik $PSF_D(x, y, z)$ und der Form des Detektors $D(x_2, y_2, z_2)$ lassen sich verschiedene praktische Raman-Mikroskope modellieren.

Für den Vergleich des Signalgewinns verschiedener Mikroskope kann jetzt eine bestimmte Konzentrationsverteilung an Raman-Streuer $c(\vec{r})$ festgelegt werden. Als geeignet erscheint eine räumlich homogene Verteilung $c(\vec{r}) = c$. Einzig für die Weitfeldmikroskopie wird später zur Begrenzung des Signals eine endliche Probenhöhe definiert. Das Signal ist nun unabhängig von der Abtastposition der Probe \vec{r}_S :

$$J = \sigma_R \cdot N_A \cdot c \iiint [I_P(\vec{r}_0) \cdot (D \otimes PSF'_D)(\vec{r}_0)] d\vec{r}_0. \quad (73)$$

Abgesehen von der Laser-Scanning-Mikroskopie (Type 1 Abtastung mit inkohärenter Detektion), die hier nicht betrachtet werden soll, da sie sich für die Spektroskopie bisher nicht als geeignet erwiesen hat, bestehen Detektoren stets aus einem bzw. mehreren getrennten Pixeln. In der Konfokalmikroskopie beeinflusst die Größe dieses Detektors die Bildqualität und die Detektionseffizienz und mit letzterer auch die Arbeitsgeschwindigkeit. Der Vergleich ganz verschiedener Mikroskopgeometrien erfordert somit strenggenommen die Berücksichtigung auch dieses Parameters. Da die relative Detektionseffizienz von konfokalen Raman-Mikroskopen vor dem Hintergrund verschiedener Detektorgrößen bereits ausführlich diskutiert ist [4], [81], [82], soll es hier ausreichen, einen Vergleich anhand repräsentativer Vertreter von Mikroskopgeometrien zu führen. Als Idealfall wird dafür, wie in Kapitel 3.1.1., ein punktförmiger Detektor mit der integralen Empfindlichkeit 1 angenommen. Damit ergibt sich für das Signal in Einheiten einer Intensität:

$$J = \sigma_R \cdot N_A \cdot c \iiint [I_P(\vec{r}_0) \cdot PSF'_D(\vec{r}_0)] d\vec{r}_0. \quad (74)$$

Um Beschreibungen weiterhin analytisch fortsetzen zu können, ist es günstig, gaußförmige Pupillen P_I und P_D (Abbildung 24) anzunehmen und entsprechend Beleuchtung und Detektion mit Hilfe gaußscher Strahlenoptik zu beschreiben.

3.1.6. Modellierung verschiedener Mikroskope mit gaußscher Strahlenoptik

Die Intensitätsverteilung eines elliptischen Gauß-Strahls (siehe Anhang A4.) ist für die Ausbreitung in z-Richtung gegeben durch:

$$I_P(x, y, z) = I_{P0} \cdot \hat{I}_P(x, y, z) \text{ mit:}$$

$$\hat{I}_P(x, y, z) = \frac{w_{0x}}{w_x(z)} \frac{w_{0y}}{w_y(z)} \cdot e^{-2\left(\frac{x}{w_x(z)}\right)^2} \cdot e^{-2\left(\frac{y}{w_y(z)}\right)^2}. \quad (75)$$

Mit geeignet gewählten Parametern lassen sich so unterschiedliche Beleuchtungsgeometrien (Anhang A5.) modellieren.

Durch Normierung gemäß Gleichung (59) lässt sich der Gauß-Strahl auch als Punktspreizfunktion verwenden. Für ein ideales Mikroskop ist die Punktspreizfunktion der Detektionsoptik PSF_D rotationssymmetrisch ($w_{0x} = w_{0y} = w_0$) entlang der optischen Achse (z-Richtung) und spiegelsymmetrisch bezüglich der xy-Ebene. In diesem Fall sind die Reflexions- und Transmissionsgeometrie äquivalent. Für alle Mikroskopgeometrien ist PSF_D demnach gegeben durch:

$$PSF_D(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{P} \text{ mit: } P = \frac{I_0 \pi}{2} \cdot w_0^2, \quad (76)$$

$$PSF_D(x, y, z) = \frac{2}{\pi} \frac{1}{w_D^2(z)} \cdot e^{-2\frac{x^2+y^2}{w_D^2(z)}}. \quad (77)$$

Durch Identifizierung der Koordinaten aus den Gleichungen (75) und (77) mit denen aus Gleichung (74) lässt sich für eine bestimmte Mikroskopgeometrie der charakterisierende Signalfaktor J_f mit der Einheit m finden:

$$J_f = \iiint \hat{I}_P(x_0, y_0, z_0) \cdot PSF_D(x_0, y_0, z_0) dx_0 dy_0 dz_0. \quad (78)$$

Die Intensität des Signals J am Detektor ergibt sich demnach zu:

$$J = I_{P0} \cdot \sigma_R \cdot N_A \cdot c \cdot J_f. \quad (79)$$

Im Anhang A6. sind die analytischen Rechnungen und Ergebnisse der Signalfaktoren J_f für das konfokale Mikroskop, das linienkonfokale Mikroskop, das Lichtschichtmikroskop, ein Mikroskop mit einer Lichtlinienbeleuchtung und das Weitfeldmikroskop angegeben. Für Mikroskopieverfahren, welche strukturierte Beleuchtung [83] zur Übertragung von Ortsfrequenzen jenseits der optischen Transferfunktion (OTF) der Detektionsoptik nutzen, entspricht der mittlere Signalfaktor für die Rohdateninformation dem eines Weitfeldmikroskops.

3.2. Signal-Rausch-Verhältnisse verschiedener Spektrometer

Eine vollständige Raman-mikrospektrometrische Vermessung einer starren Gewebeprobe liefert ein Maß für Raman gestreutes Licht als Funktion von drei Ortsdimensionen und einer spektralen Dimension. Ein lebender Organismus kann zusätzlich noch eine Zeitabhängigkeit und somit eine fünfte Dimension ins Spiel bringen. Die Empfindlichkeitsfunktion von Lichtdetektoren ist auf zwei Ortsdimensionen und eine Zeitdimension begrenzt.

Aufgabe eines Entwicklers und in einem kleineren Rahmen eines Anwenders für Raman-Mikrospektrometer ist es demnach einen Weg zu finden, die Dimensionen der Fragestellung effizient auf die Dimensionen eines verfügbaren Detektors abzubilden. Effizient heißt hierbei, dass die Abbildung in möglichst kurzer Zeit bei gleichzeitig hohem Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) erfolgen sollte.

Das SNR von verschiedenen Klassen bildgebender Spektrometer ist bereits vor dem Hintergrund der Fernerkundung verglichen worden [68]. Dabei wurde stets eine zweidimensionale Bildgebung (typischerweise von der Erdoberfläche) bei einer gleichmäßigen Beleuchtung (typischerweise von der Sonne) vorausgesetzt. Hier wird der Vergleich von [68] aufgegriffen und auf die dreidimensionale Mikrospektroskopie übertragen, wobei auch Beiträge des Photonenrauschens von nicht fokussierten Teilen der Probe berücksichtigt werden.

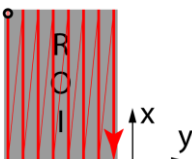
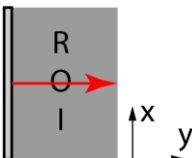
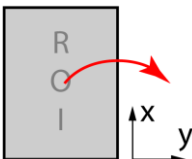
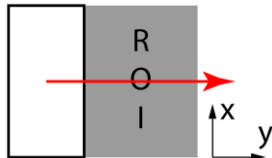
3.2.1. Einteilung bildgebender Spektrometer

Bildgebende Spektrometer lassen sich nach den beiden Merkmalen: Methode der spektralen Codierung (siehe Tabelle 5) und Methode der örtlichen Codierung (siehe Tabelle 6) einteilen. Verschiedene bildgebende Spektrometer lassen sich nun nach diesen beiden Merkmalen einordnen (siehe Anhang A7.).

Tabelle 5: Einteilung bildgebender Spektrometer anhand: Methode der spektralen Codierung

Methode spektraler Codierung	Instrumentelle Realisierung
Filterbasiert	Spektralfilter und Mehrstrahlinterferometer
Dispersiv	Prisma, Gitter
Interferometrisch	Zweistrahlinferometer: Michelson, Mach-Zehnder, Sagnac

Tabelle 6: Einteilung bildgebender Spektrometer anhand: Methode der örtlichen Codierung

Methode örtlicher Codierung	Englischer Name (Übersetzung)	Örtliche Dimensionen pro Abtastschritt	Grafische Darstellung der Abtastung einer ROI (region of interest)	Erläuterung
Punktweise	Whiskbroom (Kehrbesen)	0		
Linienweise	Pushbroom (Breitbesen)	1		
Rahmenweise	Framing (Einrahmend)	2		Rahmen bleibt für eine ROI fix; weiterer Parameter wird ggf. in Schritten verändert
Fensterweise	Windowing	2		Spektral inhomogenes Fenster wird in Schritten über die ROI gefahren

Für die dreidimensionale Bildgebung an einer Volumenprobe können die Methoden der örtlichen Codierung durch einen zusätzlichen Abtastprozess in die Tiefe erweitert werden. Dieser wird in der Regel mit einem Nachfokussieren der beobachtenden und der beleuchtenden Optik verbunden sein. Als punktweise, linienweise, rahmenweise und fensterweise werden somit, vor dem Hintergrund eines zusätzlichen schicht- bzw. etagenweisen Abtastprozesses, auch entsprechende Methoden örtlicher Codierung für drei Dimensionen benannt.

Zusätzlich sind Methoden zur (teilweise) parallelen Tiefencodierung bekannt. So kann die Tiefeninformation mit strukturierter Beleuchtung (optical sectioning SIM) [83] codiert und parallel aufgezeichnet werden [84], [85]. Geometrisch ermöglicht dies neue Spektrometerklassen, welche die Tiefe nicht sequenziell sondern parallel abtasten oder teilweise encodieren und eine anschließende mathematischen Rekonstruktion nötig wird. Da diese Klassen der Mikrospektroskope bislang noch kaum entwickelt und diskutiert sind, sollen sie im Folgenden unbeachtet bleiben.

3.2.2. Strahlungscodierung mit einem allgemeinen Spektrometer

Das von einer Probe gestreute bzw. emittierte Licht lässt sich durch eine spektrale Strahldichte $L(x, y, \theta, \varphi, \nu)$ quantifizieren. Sie gibt die Strahlungsleistung bzw. die Anzahl an Photonen pro Zeitintervall an, die die Probe an einem Punkt x, y in eine Richtung θ, φ bei einer Frequenz ν pro Fläche, Raumwinkel und Frequenzintervall abgibt.

Ein bildgebendes Spektrometer (siehe Abbildung 25) hat die Aufgabe, diese spektrale Strahl-
dichte L der Probe zu encodieren, mit Hilfe eines Detektors als ein oder mehrere Rohdaten-
bilder $R(i, j, n_t)$ zu vermessen und anschließend zu einem hyperspektralen Bild $B(x, y, \nu)$ zu
decodieren. Die Rohdatenbilder besitzen als Argument allgemein zwei diskrete Ortskoordi-
naten i, j des Sensors und eine diskrete Zeitkoordinate n_t , welche erst bei der Decodierung
den Koordinaten x, y, ν des hyperspektralen Bildes $B(x, y, \nu)$ zugeordnet werden.

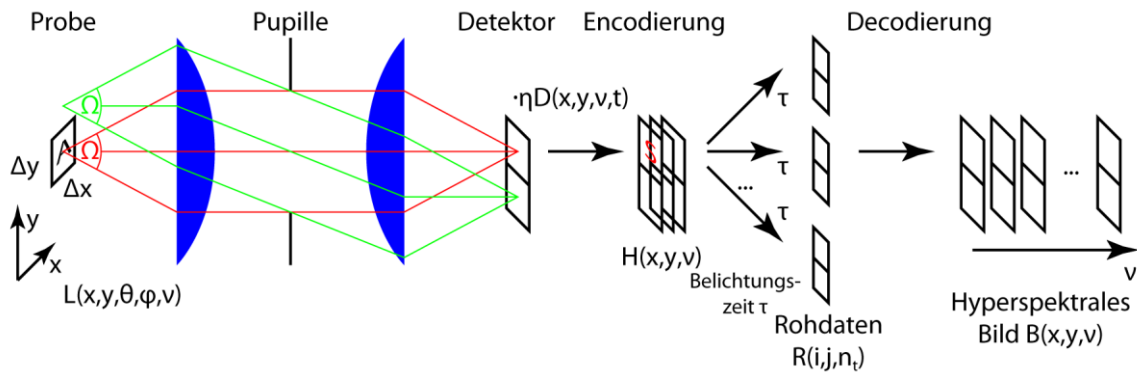


Abbildung 25: Allgemeines Spektrometer. Die spektrale Strahlendichte $L(x, y, \theta, \varphi, \nu)$, ausgehend von einer Probe am Ort x, y , wird unter einem Raumwinkel Ω über eine Zeit T gesammelt. Durch die Encodierung mit der Durchlässigkeitsfunktion $D(x, y, \nu, t)$ geht Licht verloren und es bleibt die spektrale Fluenz $H(x, y, \nu)$ zu vermessen. Dies geschieht durch die Aufnahme von einem oder mehreren Rohdatenbildern $R(i, j, n_t)$ mit je der Belichtungszeit τ . Nach einer Decodierung steht ein hyperspektrales Bild $B(x, y, \nu)$ zur Verfügung.

Zur Encodierung der spektralen Strahlendichte L ist das bildgebende Spektrometer in der Lage einen Anteil von L innerhalb einer totalen Messzeit T aufzufangen. Dieser Anteil bildet die orts- und frequenzabhängige spektrale Fluenz $H(x, y, \nu)$:

$$H(x, y, \nu) = \iint_{\Omega} \int_0^T L(x, y, \theta, \varphi, \nu) \eta D(x, y, \nu, t) d\theta d\varphi dt . \quad (80)$$

Der Raumwinkel Ω ist für ein telezentrisches System generell durch die ortsunabhängige numerische Apertur beschrieben. Mit dem Effizienzfaktor η werden alle methodisch oder praktisch bedingten Verluste berücksichtigt, die hier idealisiert als konstant angenommen werden. Die einheitenlose Durchlässigkeitsfunktion D maskiert als Funktion der Zeit t sowohl örtlich (x, y) als auch spektral (ν) die spektrale Strahlendichte L . Die Durchlässigkeitsfunktion D trägt die Vorschrift zur örtlichen und spektralen Codierung und ist somit charakteristisch für die Spektrometerklasse. Einen guten Zugang gewinnt man durch ihre grafische Darstellung (siehe Abbildung 26 und siehe Anhang A8.).

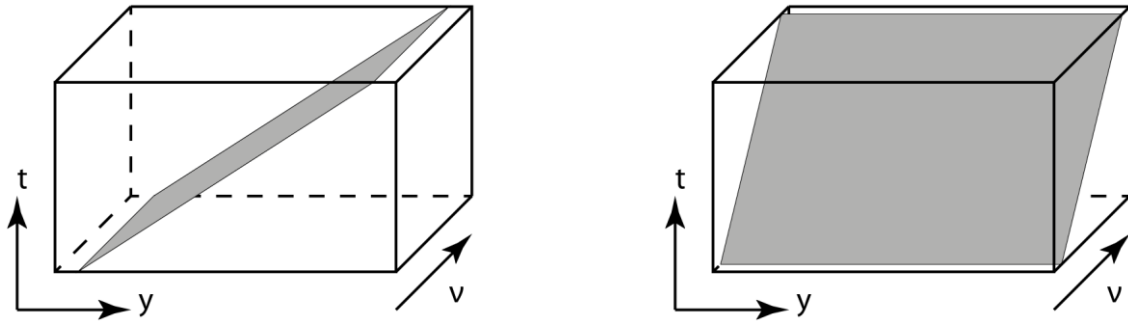


Abbildung 26: Projektion der Durchlässigkeitsfunktion $D(x, y, v, t)$ für linienweise Abtastung (links) und für rahmenweise, filterbasierte Spektrometer (rechts) mit Achsen für Zeit t , Frequenz v und Ort y . Die grauen Flächen zeigen die Orte, an denen D transparent ($D = 1$ sonst 0) ist.

Für eine konstante, homogene und isotrope spektrale Strahldichte L lässt sich die Durchlässigkeitsfunktion D des Spektrometers näher untersuchen:

$$H(x, y, v) = L\eta\Omega \int_0^T D(x, y, v, t) dt . \quad (81)$$

Sie bestimmt die Zeitspanne Δt , innerhalb derer spektrale Strahldichte $L(x, y, \theta, \varphi, v)$ von einem Punkt (x, y, v) zu der spektralen Fluenz $H(x, y, v)$ akkumuliert wird. Diese ist im Idealfall bei einem Spektrometer unabhängig von Ort und Frequenz und soll im Folgenden als spektrale Akkumulationszeit bezeichnet werden:

$$\int_0^T D(x, y, v, t) dt = \Delta t . \quad (82)$$

Das Integral lässt sich grafisch als Projektion entlang t in Abbildung 26 verstehen. Die spektralen Akkumulationszeiten Δt sind für verschiedene Spektrometerklassen in Anhang A8. aus den grafischen Darstellungen der Durchlässigkeitsfunktionen abgeleitet. Sie sind weder mit der Belichtungszeit τ für ein Rohdatenbild noch mit der totalen Messzeit T des hyperspektralen Bildes zu verwechseln. Aufgrund der einfachen Codierung der dispersiven und filterbasierten Spektrometerklassen gilt nur für diese: $\Delta t = \tau$.

3.2.3. Das absolute Signal eines 2D bildgebenden Spektrometers

Das orts- und frequenzabhängige Signal $S(x, y, v)$ des Spektrometers ergibt sich aus der spektralen Fluenz $H(x, y, v)$ für eine bestimmte Probenfläche $A = \Delta x \cdot \Delta y$ (verkleinerte Pixelgröße) und ein spektrales Intervall Δv :

$$S(x, y, v) = H(x, y, v) \cdot \Delta x \cdot \Delta y \cdot \Delta v . \quad (83)$$

Das Signal beschreibt allgemein den Anteil der spektralen Strahldichte L , der insgesamt während der totalen Messzeit T von der Probenfläche A am Ort x, y und innerhalb des Frequenzintervalls Δv dem Detektor des Spektrometers durch die vorangegangene Encodierung

zur Verfügung gestellt wird. Es besitzt die Einheit der Energie bzw. der Photonenzahl. Nur für die dispersiven und filterbasierten Spektrometerklassen entspricht das Signal $S(x, y, \nu)$, abgesehen vom Rauschen, sowohl der Rohdateninformation $R(i, j, n_t)$ der Einzelmessungen, als auch dem hyperspektralen Bild $B(x, y, \nu)$ als Ergebnis. Bei den interferometrischen Spektrometerklassen wird das hyperspektrale Bild $B(x, y, \nu)$ erst durch Fourier-Transformation aus den Rohdaten $R(i, j, n_t)$ gewonnen. Auch die Rohdateninformation und das Signal haben verschiedene Bedeutung.

Zu Vergleichszwecken wird angenommen, dass die spektrale Strahldichte auf die n_ν spektrale Abtastwerte der Breite $\Delta\nu$ und die $n_x \cdot n_y$ örtliche Abtastwerte der Fläche $\Delta x \cdot \Delta y$ gleichverteilt ist. Durch diese Annahme wird die folgende Betrachtung unabhängig von der Definition der Frequenzskale (gleiche Wellenlängenintervalle oder gleiche Wellenzahlenintervalle). Das Signal am Detektor lässt sich nun als Konstante schreiben:

$$S = L \cdot \eta \cdot \Omega \cdot \Delta t \cdot \Delta x \cdot \Delta y \cdot \Delta \nu . \quad (84)$$

3.2.4. Das relative Signal eines bildgebenden Spektrometers

Die Faktoren Δx , Δy , Ω und $\Delta \nu$ sind durch die Anforderungen an das Spektrometer festgelegt. Die spektrale Strahldichte L ist durch die Probe und die Beleuchtung festgelegt. Bei dem Signalvergleich verschiedener Spektrometer bleiben somit nur noch η und Δt als von der Spektrometerklasse abhängige Parameter übrig. Es ist daher sinnvoll einen vergleichsfähigen, einheitenlosen Signalfaktor S_f zu definieren:

$$S = S_f \cdot S_i . \quad (85)$$

Dabei gibt S_i die Energie bzw. die Anzahl an Photonen während der totalen Messzeit T an, die ein ideales Spektrometer (rahmenweise, panchromatisch ohne Verluste, siehe auch Anhang A8.) von einer Probe akkumuliert:

$$S_i = L \cdot \Omega \cdot T \cdot \Delta x \cdot \Delta y \cdot \Delta \nu . \quad (86)$$

Demnach gilt:

$$S_f = \frac{\eta \Delta t}{T} . \quad (87)$$

Der Signalfaktor S_f lässt sich nun für verschiedene Spektrometerklassen leicht aus der charakteristischen spektralen Akkumulationszeiten Δt (siehe Anhang A8.) bestimmen. Zum Vergleich ist auch die Belichtungszeit für einzelne Rohbilder τ angegeben. Diese ergibt sich als Quotient der totalen Messzeit T und der Anzahl der sequentiellen Rohdatenbilder n_k .

3.2.4.1. *Das relative Signal für Volumenproben*

Volumenproben lassen sich, wie in Kapitel 3.2.1. erwähnt, in Schichten sequenziell, optisch vermessen. Die totale Messzeit \hat{T} für eine Volumenprobe aus n_z Schichten ergibt sich somit zu:

$$\hat{T} = T \cdot n_z . \quad (88)$$

Für Volumenproben wird der Signalfaktor damit zu:

$$S_f = \frac{\eta \Delta t}{\hat{T}} . \quad (89)$$

Ein hoher Signalfaktor führt noch nicht zwangsläufig zu einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis (SNR). Um Aussagen darüber machen zu können, muss auch das Rauschen der verschiedenen Spektrometerklassen näher untersucht werden.

3.2.5. **Das absolute SNR eines bildgebenden Spektrometers**

Rauschen lässt sich in zwei Kategorien unterscheiden: signalabhängiges Rauschen und signalunabhängiges Rauschen. Signalabhängiges Rauschen wird hauptsächlich durch das poissonverteilte Photonenrauschen hervorgerufen (Schrotrauschen). Bei einer Poissonverteilung sind Erwartungswert und Varianz gleich. Die Standardabweichung des signalabhängigen Rauschens N_p lässt sich demnach aus der Signalamplitude S wie folgt abschätzen:

$$N_p = \sqrt{S} . \quad (90)$$

Signalunabhängiges Rauschen entsteht durch verschiedene physikalische Prozesse im Detektor selbst und durch zusätzliches Hintergrundlicht. Die Standardabweichung des Detektorrauschens (auch Dunkelrauschen) heißt N_d . Das Signal des Hintergrundlichts S_b , welches z.B. aus nicht fokussierten Teilen der Probe herrühren kann, steuert unabhängig vom gewünschten Signal Schrotrauschen mit der Standardabweichung N_b bei:

$$N_b = \sqrt{S_b} . \quad (91)$$

Da das signalabhängige Rauschen und das signalunabhängige Rauschen verschiedene Ursachen haben, ist zu erwarten, dass sie statistisch nicht korreliert sind. Das Gesamtrauschen N des Bildsignals nach dem Detektor ergibt sich demzufolge (anders als in [68]) gemäß:

$$N^2 = N_p^2 + N_b^2 + N_d^2 . \quad (92)$$

3.2.5.1. Filterbasierte und dispersive Spektrometerklassen

Für die hier diskutierten filterbasierten und dispersiven Spektrometerklassen entspricht das Signal $S(x, y, \nu)$ abgesehen vom Rauschen $N(x, y, \nu)$ allgemein sowohl der Rohdateninformation $R(i, j, n_t)$ der Einzelmessungen, als auch dem hyperspektralen Bild $B(x, y, \nu)$ als Ergebnis (triviale Codierung):

$$B(x, y, \nu) = R(i, j, n_t) = S(x, y, \nu) + N(x, y, \nu) . \quad (93)$$

Für die rahmenweise Abtastung gilt die Zuordnung: $i = x, j = y, n_t = \nu$ und für die linienweise: $i = x, n_t = y, j = \nu$ (vergleiche auch grafische Darstellungen Anhang A8.). Das SNR des hyperspektralen Bildes SNR_B ergibt sich somit direkt aus der Definition als Verhältnis aus Erwartungswert und Standardabweichung. Der Erwartungswert wird mit dem Signal S identifiziert und die Standardabweichung mit dem Gesamtrauschen N :

$$SNR_B = \frac{S}{N} = \frac{S}{\sqrt{N_p^2 + N_b^2 + N_d^2}} = \frac{S}{\sqrt{S + S_b + N_d^2}} . \quad (94)$$

3.2.5.2. Interferometrische Spektrometerklassen

Bei den interferometrischen Spektrometerklassen wird das hyperspektrale Bild $B(x, y, \nu)$ erst durch Fourier-Transformation aus den Rohdaten $R(i, j, n_t)$ gewonnen. Die Rohdaten $R(i, j, n_t)$ hängen wiederum nicht trivial mit dem Signal $S(x, y, \nu)$ zusammen. Zum SNR des hyperspektralen Bildes SNR_B kommt neben dem Verhältnis aus Erwartungswert und Standardabweichung noch ein zusätzlicher Faktor hinzu. Der Erwartungswert wird wieder mit dem Signal S (nicht mit der Rohdateninformation $R(i, j, n_t)$ wie in [68] behauptet) identifiziert und die Standardabweichung mit dem Gesamtrauschen N . Der Faktor zur Transformation des SNR in das des hyperspektralen Bildes für interferometrische Spektrometer ergibt sich aus der Herleitung in [69] (geschweifte Klammer):

$$SNR_B(\nu) = \left\{ \left[\frac{S(\nu)}{\bar{S}} \right] \sqrt{\frac{1}{n_\nu}} \right\} \cdot \frac{S}{N} = \left\{ \left[\frac{S(\nu)}{\bar{S}} \right] \sqrt{\frac{1}{n_\nu}} \right\} \cdot \frac{S}{\sqrt{S + S_b + N_d^2}} . \quad (95)$$

Dabei gibt $S(\nu)$ das Signal eines bestimmten spektralen Abtastwertes und \bar{S} das durchschnittliche Signal über alle spektralen Abtastwerte an. Die Anzahl der Spektralklassen ist durch n_ν gegeben. Das nicht korrelierte Rauschen aus den Interferenzdaten wird somit signalunabhängig auf die rekonstruierten Daten eines Spektrums verteilt. Dadurch wird das SNR des Spektrums signalabhängig in der Weise, dass ein starkes, spektral lokalisiertes Signal den Rauschteppich des gesamten Spektrums anhebt. Wird das Signal $S(x, y, \nu)$ wie zuvor zu Vergleichszwecken als spektral konstant betrachtet, ergibt das Verhältnis aus $S(\nu)$ und \bar{S} einfach Eins.

3.2.6. Das relative SNR eines bildgebenden Spektrometers

Da das SNR verschiedener Spektrometer verglichen werden soll, wird analog zum mit Gleichung (85) eingeführten Signalfaktor S_f auch ein SNR-Faktor SNR_f mit der Einheit \sqrt{S} eingeführt:

$$SNR_B = SNR_f \cdot \sqrt{S_i}. \quad (96)$$

Dabei gibt S_i die in Gleichung (86) eingeführte Strahlungsleistung bzw. die Anzahl an Photonen pro Zeitintervall, die ein ideales Spektrometer (rahmenweise, panchromatisch ohne Verluste, siehe auch Anhang A8.), von einer Probe akkumuliert. Für das signalabhängige Rauschen N_p ergibt sich aus den Gleichungen (85) und (90):

$$N_p^2 = S_f \cdot S_i. \quad (97)$$

Das signalunabhängige Rauschen $\sqrt{S_b + N_d^2}$ lässt sich durch das signalabhängige Rauschen N_p über einen Rauschfaktor q_S ausdrücken:

$$S_b + N_d^2 = q_S^2 \cdot N_p^2. \quad (98)$$

Anders als in [68] bestimmt er das Verhältnis zwischen dem signalunabhängigen Rauschen und dem Photonenrauschen N_p des Signals. Auf diese Weise lässt sich der Anteil des Lichts außerhalb des Fokus elegant mit dem Rauschfaktor erfassen. Mit Gleichung (90) lässt sich q_S schreiben als:

$$q_S = \frac{\sqrt{S_b + N_d^2}}{\sqrt{S}}. \quad (99)$$

Der Rauschfaktor q_S ist dadurch (gesamt-)signalabhängig wodurch auch der SNR-Faktor wieder signalabhängig wird. Für $q_S = 0$ existiert kein Detektorrauschen und kein Hintergrundlicht. Für $q_S = 1$ ist das Detektorrauschen zusammen mit dem Photonenrauschen des Hintergrundlichts gleich dem Photonenrauschen des Signals S . Für eine $100 \mu\text{m}$ hohe, semitransparente und homogene Probe ergibt sich in einem Weitfeldmikroskop mit $1 \mu\text{m}$ Schärfentiefe unter Vernachlässigung von Detektorrauschen beispielsweise ein Rauschfaktor von: $q_S = 100$.

Der Wert für das Detektorrauschen N_d lässt sich entweder direkt aus dem Datenblatt des Detektors entnehmen oder leicht durch eine statistische Analyse von Dunkelbildern ermitteln. Zur Bestimmung des Rauschfaktors q_S muss zusätzlich S bekannt sein. Wenn ein bereits existierendes bildgebendes System untersucht werden soll, so lässt sich S aus den Rohdaten abschätzen. Dafür ist es notwendig, dass der Detektor zuvor kalibriert wurde. Es muss also die Anzahl an Analog-Digital-Wandler-Einheiten pro Photoelektron (nicht notwendigerweise pro Photon) bekannt sein (siehe beispielsweise Anhang A3.).

Für filterbasierte und dispersive Spektrometer ergibt sich aus den Gleichungen (96), (94), (85) und (99) ein SNR-Faktor von:

$$SNR_f = \frac{S}{\sqrt{S + S_b + N_d^2}} \frac{1}{\sqrt{S_i}} = \frac{S_f \cdot S_i}{\sqrt{S_f \cdot S_i + q_S^2 \cdot S_f \cdot S_i}} \frac{1}{\sqrt{S_i}} = \frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{S_f}. \quad (100)$$

Für die Interferometer basierten Spektrometer muss wieder beachtet werden, dass das Rauschen zusammen mit den Rohdateninformationen transformiert wird. Aus den Gleichungen (95) und (100) ergibt sich somit:

$$SNR_f = \left\{ \left[\frac{S(\nu)}{\bar{S}} \right] \sqrt{\frac{1}{n_\nu}} \right\} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{S_f}. \quad (101)$$

Der Vorteil interferometrischer Spektrometer gegenüber den dispersiven und filterbasierten Spektrometerklassen liegt im hohen Signal im Vergleich zum Detektorrauschen (typ. $\Delta t \gg \tau$ siehe Anhang A8.). Dadurch werden diese gerade für Infrarot-Anwendungen attraktiv, wo das Detektorrauschen aus thermischen Gründen in der Größenordnung der spektralen Strahldichte liegen kann.

Die SNR-Faktoren sind für alle diskutierten Klassen von bildgebenden Spektrometern in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Signalfaktoren S_f und SNR-Faktoren SNR_f verschiedener Klassen bildgebender Spektrometer für örtlich 3-dimensionale Proben⁵

Örtliche Auflösung (Spektrale Aufl.)	Signalfaktor S_f (Gleichung (89))	SNR-Faktor SNR_f (Gleichung (100) bzw. (101))
Punktweise (Dispersiv)	$\frac{\eta}{n_x n_y n_z}$	$\frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_x n_y n_z}}$
Linienweise (Dispersiv)	$\frac{\eta}{n_y n_z}$	$\frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_y n_z}}$
Linienweise (Interferometrisch)	$\frac{\eta}{n_y n_z}$	$\left\{ \left[\frac{S(\nu)}{\bar{S}} \right] \sqrt{\frac{1}{n_\nu}} \right\} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_y n_z}}$
Rahmenweise (Filterbasiert)	$\frac{\eta}{n_\nu n_z}$	$\frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_\nu n_z}}$
Rahmenweise (Interferometrisch)	$\frac{\eta}{n_z}$	$\left\{ \left[\frac{S(\nu)}{\bar{S}} \right] \sqrt{\frac{1}{n_\nu}} \right\} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_z}}$
Rahmenweise (Panchromatisch/ dispersiv)	$\frac{\eta}{n_z}$	$\frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_z}}$
Fensterweise (Filterbasiert)	$\frac{\eta}{n_z n_\nu n_y + n_j}$	$\frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_z n_\nu n_y + n_j}}$
Fensterweise (Interferometrisch)	$\frac{\eta}{n_z n_y + n_j}$	$\left\{ \left[\frac{S(\nu)}{\bar{S}} \right] \sqrt{\frac{1}{n_\nu}} \right\} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_z n_y + n_j}}$

Bedeutung der Parameter:

- n_x Anzahl der örtlichen Abtastwerte in x-Richtung
- n_y Anzahl der örtlichen Abtastwerte in y-Richtung
- n_z Anzahl der örtlichen Abtastwerte in z-Richtung
- n_ν Anzahl der spektralen Abtastwerte in ν -Richtung
- n_j Anzahl der Detektorpixel in y-Richtung (nur für fensterweises Abtasten)
- q_S Rauschfaktor
- $S(\nu)$ Signal in einem spektralen Abtastwert (nur für Interferometer)
- \bar{S} Durchschnittliches Signal eines Spektrums (nur für Interferometer)
- η sonstige Effizienz (z.B. für Absorption oder $\frac{1}{2}$ für nur einen Interferometerausgang)

⁵ Die Ergebnisse haben nur noch entfernt Ähnlichkeit mit denen aus [68]. Dies liegt hauptsächlich an der korrigierten quadratischen Addition des Rauschens, der veränderten Normierung des Rauschfaktors, dem Verzicht der Betrachtung eines langen Schwads (Aufnahmestreifens) und der eingeführten dritten Dimension.

3.3. Einfluss der Beleuchtung auf eine Probe

Ziel der Mikroskopie ist, die Struktur einer Probe aufzuklären ohne diese dabei zu verändern. Eine wichtige Grenze ist in der Lichtmikroskopie dabei die optische Zerstörschwelle. In [86] sind in Abhängigkeit der Feldstärke vier physikalische Mechanismen für sichtbare bis infrarote Strahlung benannt, die zur optischen Zerstörung von optischen Materialien führen:

- Lineare Absorption, führt zu lokaler Erwärmung und zur Spaltung von optischen Materialien. Dies ist der dominante Zerstörungsmechanismus für kontinuierliche Laserstrahlung und lange Pulse ($> 1 \mu\text{s}$).
- Lawinendurchbruch, ist der dominante Mechanismus für gepulste Laser ($< 1 \mu\text{s}$) für Intensitäten im Bereich von $10^4 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ bis $10^7 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$.
- Multiphotonenionisation oder Multiphotonendissoziation des optischen Materials, ist der dominante Mechanismus für Intensitäten im Bereich von $10^7 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ bis $10^{11} \text{ mW}/\mu\text{m}^2$.
- Direkte (Einzelzyklen) Feldionisation, ist der dominante Mechanismus für Intensitäten über $10^{15} \text{ mW}/\mu\text{m}^2$.

Die bisher in dieser Arbeit diskutierten Beleuchtungen für die Raman-Mikroskopie lagen bei Bestrahlungsstärken von bis zu $300 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ und Beleuchtungsdauern von über 30 ms. Der einzige Zerstörmechanismus der demnach aus der Liste diskutiert werden muss, ist die lineare Absorption. Bemerkenswert ist, dass der Lawinendurchbruch nur gut eine Größenordnung weit von den Bedingungen, wie sie in dem in Kapitel 2.8. verwendeten konfokalen Raman-Mikroskop herrschen, entfernt liegt. Für eine Konfiguration mit einem 1 W-Laser kann der Lawinendurchbruch in der konfokalen Raman-Mikroskopie zu einem relevanten Zerstörungsmechanismus werden.

3.3.1. Beleuchtung einer Probe

Die volumetrische Wärmestromdichte, die durch lineare Absorption an einem Punkt \vec{r} der Probe entsteht, lässt sich als Quellterm $q_V(\vec{r}, t)$ in Abhängigkeit von der Intensität $I(\vec{r}, t)$ und dem Absorptionskoeffizient $\mu_a(\vec{r})$ schreiben:

$$q_V(\vec{r}, t) = \mu_a(\vec{r})I_P(\vec{r}, t) . \quad (102)$$

Der Absorptionskoeffizient $\mu_a(\vec{r})$ ist dabei stark von der Probe und der verwendeten Wellenlänge abhängig. Benutzt man als Intensitätsverteilung der Anregung $I_P(\vec{r}, t)$ direkt das Ergebnis aus der gaußschen Strahlenoptik (Anhang A4.), so wird nicht berücksichtigt, dass das Licht in einer Probe mit der Eindringtiefe $l(\vec{r})$ nach dem Lambert-Beerschen Gesetz abnimmt:

$$I(\vec{r}) = I_0(\vec{r})e^{-\mu_a(\vec{r}) \cdot l(\vec{r})} . \quad (103)$$

Oft liegt jedoch der Streukoeffizient μ_s mikroskopischer Proben ohne Farbstoffe ein bis zwei Größenordnungen über dem Absorptionskoeffizienten μ_a (für Hirngewebe im nahen Infrarot gilt: $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$ während: $\mu_a \approx 0,1 \text{ mm}^{-1}$ [80]). Da Bilder mit einem guten Kontrast nur innerhalb der ersten Streulänge ($1/\mu_s$) aufgenommen werden können, darf der Einfluss der exponentiellen Intensitätsabnahme durch Absorption für die Erwärmung vernachlässigt werden. Für die Berechnungen in Kapitel 3.1. und Kapitel 3.4. wird daher die Näherung einer nicht verarmenden Anregung genutzt.

3.3.2. Zerstörung einer Probe durch zu hohe Temperaturen

Lineare Absorption wird auch vor dem Hintergrund biologischer Gewebe in der Laserchirurgie in [30] als wichtigster Prozess diskutiert. Die zeit- und temperaturabhängige Zerstörungsfunktion $\Omega(T)$ ist dort als Arrhenius-Integral gegeben:

$$\Omega(T) = \ln\left(\frac{C(0)}{C(\tau)}\right) = A \int_0^T e^{-\frac{E_a}{Ru(t)}} dt . \quad (104)$$

Die Bedeutung der Größen mit Werten für Schweinehaut aus [30] ist dabei:

- T gesamte Zeit bei erhöhter Temperatur,
- $C(0)$ Anfangskonzentration von nicht zerstörtem Gewebe,
- $C(\tau)$ Endkonzentration von verbleibendem nicht zerstörtem Gewebe,
- A Empirischer Vorfaktor mit der Einheit einer Frequenz: $3,1 \cdot 10^{98} \text{ s}^{-1}$,
- E_a Aktivierungsenergiebarriere: $6,28 \cdot 10^5 \text{ J/mol}$,
- R Universelle Gaskonstante: $8,32 \cdot 10^5 \text{ J/mol K}$,
- u absolute Temperatur.

Durch das exponentielle Verhalten der Arrhenius-Gleichung lässt sich eine kritische Temperatur u_{crit} für eine Zerstörungsrate von $d\Omega/dt = 1$ als Zerstörungsschwelle definieren:

$$u_{crit} = \frac{E_a}{R \ln A} = 60^\circ \text{ C} . \quad (105)$$

Bei einer um 10 K geringeren Temperatur liegt die Zerstörungsrate bereits über 3 Größenordnungen niedriger.

In [30] sind die zu erwartenden Formen irreversibler Gewebeerstörung für Temperaturen über u_{crit} aufgelistet:

- Gerinnung (coagulation): Die Denaturierung von Zell- und Gewebeproteinen ist die Basis für das Gewebeschweißen (in der Laserchirurgie).
- Verdampfung (vaporization): Die Gewebedehydratisierung und das Entstehen von Dampfblasen (Vakuolisierung) bei Temperaturen $\geq 100^\circ \text{ C}$ (für Normaldruck) bildet die Basis der mechanischen Zerstörung von Gewebe.
- Pyrolyse (pyrolysis): Bei Temperaturen von 350° C bis 450° C ist die Zersetzung die Basis für chemische Veränderungen im Gewebe aufgrund von Wärme.
- Die Kombination aus Verdampfung, Vakuolisierung und Pyrolyse führt zur thermischen Ablation, der Basis laserchirurgischer Entfernung von Gewebe.

Aus praktischen Erfahrungen, die während dieser Arbeit gesammelt wurden und aus der angegebenen Literatur [30], [86] lässt sich generell für fixiertes Gewebe in Wasser eine Zerstörung bei ca. 100° C durch Verdampfung feststellen. Für die Probeneinbettung in Standard-Agarose rückt die kritische Temperatur in den Schmelzbereich von $80 - 95^\circ \text{ C}$ [87].

Als nächstes gilt es, aus dem Kriterium der thermischen Zerstörschwelle die maximal zulässige Bestrahlungsstärke für den Zeitraum der Beleuchtung T für verschiedene Beleuchtungsgeometrien abzuleiten. Diskutiert werden müssen dazu Mechanismen, die die Probe durch Abtransport von Wärme schützen. Wärmeleitung bzw. -diffusion ist dabei der Hauptmechanismus. Wärmekonvektion kann als Kühlmechanismus ausgeschlossen werden, da es sich um eine starre Probe handelt. Das Maximum der Strahlungsdichte eines schwarzen Körpers liegt gemäß des Wien-Verschiebungsgesetzes [66] für 100° C bei $13,6 \mu\text{m}$. Der Absorptionskoeffizient bei dieser Wellenlänge liegt für Wasser bei $\mu_{abs} \approx 100 \text{ mm}^{-1}$ [88]. Die mittlere Eindringtiefe dieser Strahlung liegt also bei $7 \mu\text{m}$. Für größere Distanzen geht die Wärmestrahlung somit wieder in eine Diffusion (durch die vierte Potenz der Temperatur bei der Strahlung eines schwarzen Körpers mit temperaturabhängigem Diffusionskoeffizienten) über. Für kürzere Distanzen (z.B. den Fokus in einem konfokalen Mikroskop $d \approx 500 \text{ nm}$) ist das Modell des schwarzen Strahlers nicht mehr anwendbar, da die Emissionswellenlänge länger als das Objekt selbst ist und dieses keine absorbierende Oberfläche besitzt sondern selbst fast durchsichtig ist. Die Anwendung des Stefan-Boltzmann-Gesetzes für einen schwarzen Strahler würde also eine viel zu schnelle Abkühlung vorhersagen. Führt man trotzdem eine Überschlagsrechnung mit Hilfe des Stefan-Boltzmann-Gesetzes [66] an einer kleinen ($d \approx 500 \text{ nm}$) schwarzen Kugel aus Wasser von 80° C in einer Umgebung von 25° C durch und nimmt einen konstantem Energieverlust durch Strahlung an (praktisch langsamer durch die vierte Potenz der Temperatur), so führt diese zu einer Abkühlzeit von 45 ms .

Da dieser Wert in der Größenordnung des Abtastprozesses eines konfokalen Mikroskops liegt, kann auch Wärmestrahlung für eine reale Probe gegenüber der Wärmediffusion vernachlässigt werden. In der Biowärmeleitungsgleichung, die z.B. Anwendung in der Laserchirurgie findet, wird ebenfalls allein Wärmediffusion berücksichtigt und nur bei einem aktiven Blutkreislauf kommt ein Durchblutungsterm hinzu [30].

In der Fluoreszenzmikroskopie ist oftmals nicht die Zerstörung der Probe selbst sondern das Bleichen der Fluoreszenz das limitierende Kriterium für Bildqualität und Messgeschwindigkeit. Da das Bleichen der Fluoreszenz direkt mit der Bestrahlungsstärke verbunden sein kann, müssen dort andere Zerstörmechanismen [10], [89] berücksichtigt werden. Für die (hyperspektrale) Fluoreszenzmikroskopie ist demzufolge ein anderes Ergebnis des Geschwindigkeitsvergleichs zu erwarten.

3.4. Wärmediffusion in einer Probe

Mit dem Wärmequellterm $q_V(\vec{r}, t)$ und der Grenztemperatur u_{crit} sind Ursache und Kriterium für die Probenzerstörung gefunden. Die Wärmeleitungsgleichung [30], [90], [91], als eine partielle Differentialgleichung (PDGL), beschreibt die Temperaturveränderung in der Probe in Abhängigkeit der Zeit und einer Quelle⁶. Für eine räumlich homogene und konstante Temperaturleitfähigkeit a gilt:

$$\left[\frac{\partial}{\partial t} - a \nabla^2 \right] u(\vec{r}, t) = f(\vec{r}, t) . \quad (106)$$

Die Temperaturleitfähigkeit a (in m^2/s) ist gegeben durch:

$$a = \frac{k}{\rho c_p} \quad (107)$$

und die Inhomogenität der PDGL $f(\vec{x}, t)$ (in K/s) ist gegeben durch:

$$f(\vec{x}, t) = \frac{1}{\rho c_p} q_V(\vec{r}, t) . \quad (108)$$

Insgesamt ergibt sich aus den Gleichungen (106)-(108):

$$\left[\frac{\partial}{\partial t} - \frac{k}{\rho c} \nabla^2 \right] u(\vec{r}, t) = \frac{1}{\rho c_p} q_V(\vec{r}, t) . \quad (109)$$

⁶ Der Quellterm der Wärmeleitungsgleichung wird als Inhomogenität der Differentialgleichung bezeichnet. Demnach heißt eine quellenfreie Differentialgleichung homogen. Diese Art der Homogenität hat nichts mit den Eigenschaften der Probe zu tun. In der folgenden Diskussion wird stets eine homogene Probe angenommen.

Die Bedeutung der Größen mit Werten für Wasser ist dabei:

- ρ Dichte der Probe: 998 kg/m^3 [34],
- c_p spezifische Wärmekapazität: $4190 \text{ J/(kg} \cdot \text{K)}$ [34],
- $u(\vec{r}, t)$ Temperaturverteilung in der Probe in K ,
- k Wärmeleitfähigkeit: $0,6 \text{ W/(m} \cdot \text{K)}$ [92],
- $q_V(\vec{r}, t)$ Wärmequellterm aus Gleichung (102) in W/m^3 .

Mit dem Wärmequellterm aus Gleichung (102) ergibt sich für einen konstanten Absorptionskoeffizienten μ_a :

$$\left[\frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial t} - \nabla^2 \right] u(\vec{r}, t) = \frac{\mu_a}{k} I_P(\vec{r}, t). \quad (110)$$

Um diese Gleichung für verschiedene Beleuchtungsgeometrien (Anhang A5.) zu lösen, ist es nötig, die Geometrie der Probe und den Zeitverlauf der Beleuchtung festzulegen. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf Volumenproben liegt, ist es sinnvoll, den Beleuchtungsvergleich auf eine würfelförmige Probe mit der Kantenlänge $2l$ und mit einer Beleuchtung symmetrisch zum Zentrum zu beziehen (siehe Abbildung 27 links). Die zeitabhängige Beleuchtungsfunktion $I_P(\vec{r}, t)$ ist dabei mit der Beleuchtungsdauer T in drei Zeitabschnitte geteilt (siehe Abbildung 27 rechts):

$$I_P(\vec{r}, t) = \begin{cases} 0, & t \in (-\infty, 0) \\ I_P(\vec{r}), & t \in [0, T] \\ 0, & t \in (T, \infty) \end{cases}. \quad (111)$$

Als weitere Idealisierung wird angenommen, dass die Anfangstemperaturverteilung konstant ist: $u(\vec{r}, 0) = u_0$

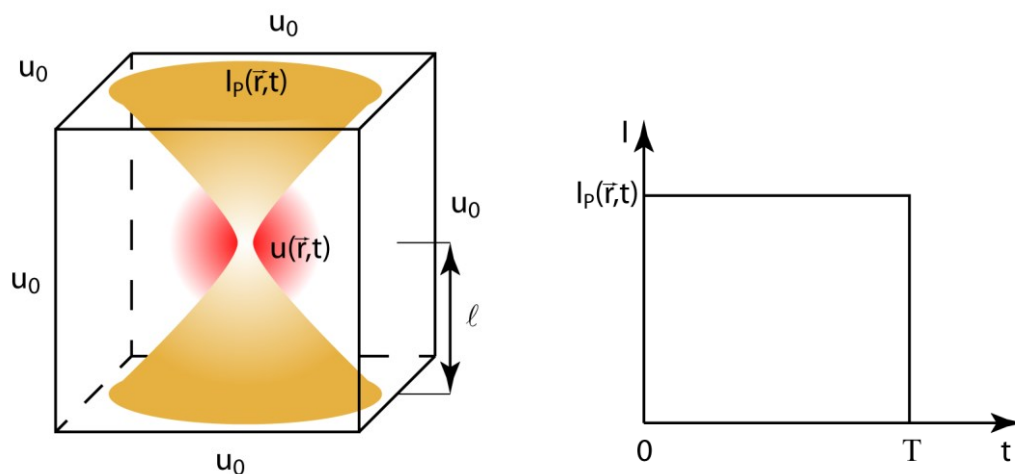


Abbildung 27: links: homogene und würfelförmige Probe mit der Kantenlänge $2l$ im Wärmebad der Temperatur u_0 und mit symmetrischer Beleuchtung eines konfokalen Mikroskops, rechts: Zeitverlauf der Beleuchtung mit der Beleuchtungsdauer T

Die vollständige Lösung der Wärmeleitungsgleichung enthält das Temperaturfeld zu jedem Zeitpunkt an jedem Ort. Hier ist jedoch nur die Maximaltemperatur, die jemals in der Probe angenommen wird, interessant. Bei zeitlich konstanter Beleuchtung und gleichmäßiger Anfangstemperaturverteilung ist diese Maximaltemperatur aufgrund des Maximumprinzips genau am Ende dieser Beleuchtungsdauer T zu erwarten.

Das Wärmeleitungsproblem lässt sich abhängig von der Beleuchtungsdauer T in vier Grenzfällen betrachten (zur Fallunterscheidung vergleiche auch Kapitel 3.4.2.2.):

- 1.) **Ohne Diffusion:** Die Beleuchtungsdauer T ist zu kurz, als dass Wärmeenergie währenddessen diffundieren kann. Dadurch genügt zur Temperaturbestimmung die Betrachtung der lokalen Wärmekapazität der Probe.
- 2.) **Freie Diffusion:** Nur ein Bruchteil der eingebrachten Wärmeenergie ist nach der Zeit T vom Zentrum der Probe bis zum Rand diffundiert. In diesem Fall lässt sich die Probe als unendlich ausgedehnt betrachten. Zu lösen bleibt das inhomogene Cauchy-Problem der Wärmeleitungsgleichung mit der konstanten Anfangstemperaturverteilung $u(\vec{r}, 0) = u_0$.
- 3.) **Begrenzte Diffusion:** Ein wesentlicher Teil der eingebrachten Wärmeenergie ist nach der Zeit T bis zum Rand der Probe diffundiert, wobei noch immer mehr Wärme eingebracht wird als über die Ränder abfließt. Zu lösen ist das inhomogene Cauchy-Problem der Wärmeleitungsgleichung mit Dirichletschen Randbedingungen (feste Randwerte) und der konstanten Anfangstemperaturverteilung $u(\vec{r}, 0) = u_0$.
- 4.) **Thermisch stationärer Zustand:** Nach langer Zeit T ist Gleichheit zwischen eingebrachter Wärmeleistung und über die Ränder abfließender Wärmeleistung erreicht. Zu lösen bleibt das Dirichlet-Problem einer Poisson-Gleichung (stationäre, inhomogene Wärmeleitungsgleichung).

Prinzipiell kann für jede in Anhang A5. genannte Beleuchtungsgeometrie jeder dieser vier Grenzfälle der Wärmeleitung eintreten. Eine einzige, allgemeine Lösung wäre daher wünschenswert.

Es wird sich jedoch zeigen, dass sich aus Symmetriegründen bei einigen Beleuchtungsgeometrien und bestimmten Grenzfällen der Wärmeleitung elegante und niedrigdimensionale analytische Lösungen für die Maximaltemperatur finden lassen. Analytische Lösungen haben den Vorteil gegenüber numerischen, dass dort Parameter bedenkenlos auf weiten Skalen variiert werden können, ohne dass Genauigkeitsprobleme auftauchen. Der allgemeinste Fall, die begrenzte Diffusion, lässt sich mit vertretbarem Aufwand nur noch numerisch behandeln.

In den folgenden Abschnitten werden Lösungen $u(\vec{r}, T)$ der Diffusionsgleichung und der Poisson-Gleichung für die in Anhang A5. genannten Beleuchtungsgeometrien vor dem Hintergrund der gaußschen Strahlenoptik (Anhang A4.) gefunden. Diese Lösungen werden jeweils (teils implizit) nach der maximal erlaubten Spitzenbestrahlungsstärke I_{P0} in der Probe umgestellt. Die Ausdrücke lassen sich so normieren, dass sich vergleichsfähige Temperaturfaktoren $u_f(T)$ ergeben, die um den Absorptionskoeffizienten μ_a und die maximale Temperatur u_{crit} bereinigt sind. Auf diese Weise kann der Geschwindigkeitsvergleich verschiedener Mikrospektrometer unabhängig vom absoluten Absorptionskoeffizienten der Probe und dem absoluten Wert für die Zerstörschwelle u_{crit} erfolgen. Entscheidend ist die Annahme, dass die Zerstörung der Probe durch das Überschreiten einer bestimmten Temperaturschwelle hervorgerufen wird und der einzige entgegenwirkende Mechanismus das Abwandern von Wärme durch Diffusion, ist.

3.4.1. Die Temperaturentwicklung ohne Diffusion

Für sehr kurze Beleuchtungsdauern T kann die Wärmeleitfähigkeit k und somit die Temperaturleitfähigkeit a vernachlässigt werden. Für die Temperatur spielen nur noch die Wärmekapazität und die Quellenergie eine Rolle. Von der Wärmeleitungsgleichung (110) verbleibt:

$$\frac{\partial}{\partial t} u(\vec{r}, t) = \frac{\mu_a}{\rho c_p} I_P(\vec{r}, t). \quad (112)$$

Für eine während T konstante Beleuchtung $I_P(\vec{r})$ lässt sich die Gleichung direkt integrieren und die Temperaturverteilung schreiben als:

$$u(\vec{r}, T) = I_P(\vec{r}) \mu_a \frac{T}{\rho c_p} + u_0(\vec{r}). \quad (113)$$

Der Ort der maximalen Temperaturerhöhung fällt somit mit dem Ort der maximalen Beleuchtung zusammen. Es ist hier nicht nötig, verschiedene Beleuchtungsgeometrien zu unterscheiden. Stellt man das Ergebnis nach der Spitzenintensität $I_{P0}(T)$ in der Probe um und identifiziert die Temperatur mit u_{crit} so ergibt sich als Kriterium für die Beleuchtung:

$$I_{P0}(T) \leq (u_{crit} - u_0) \frac{\rho c_p}{\mu_a T}, \quad (114)$$

wobei die Beleuchtungsdauer T als Parameter zu verstehen ist.

Der vergleichsfähige Temperaturfaktor $u_f(T)$ ergibt sich durch Normierung:

$$I_{P0}(T) = \frac{(u_{crit} - u_0)}{\mu_a} \cdot u_f(T) \quad (115)$$

zu:

$$u_f(T) = \frac{\rho c_p}{T}. \quad (116)$$

An Gleichung (113) ist zu erkennen, dass das Produkt $I_{P0}(T) \cdot T$ eine Konstante ist. Das bedeutet, dass ohne Abtransport von Wärmeenergie nur eine bestimmte wärmekapazitätsabhängige Menge an Energie in die Probe eingebracht werden darf und damit verbunden auch nur eine bestimmte Menge an Raman gestreutem Licht emittiert werden kann. Die Beleuchtungsdauer T , welche hier identisch mit der totalen Messzeit T (Kapitel 3.2.) ist, spielt für den Signalgewinn bei dieser Idealisierung keine Rolle. Bemerkbar macht sich dies bei der Weitfeldbeleuchtung von großen Volumenproben.

3.4.2. Die freie Diffusion

Die Lösungsformel für das inhomogene Cauchy-Problem der Wärmeleitungsgleichung mit beliebigen Anfangswerten setzt sich linear aus der Lösung des homogenen und der Lösung des inhomogenen Problems mit Null-Anfangswerten zusammen [91]:

$$u(\vec{r}, t) = \int_{\mathbb{R}^n} u_0(\vec{r}') \cdot H_n(\vec{r} - \vec{r}', t) d\vec{r}' + \int_{-\infty}^{\infty} \int_{\mathbb{R}^n} f(\vec{r}', t') \cdot H_n(\vec{r} - \vec{r}', t - t') d\vec{r}' dt'. \quad (117)$$

Beide Teillösungen bestehen aus einem Faltungsintegral mit der Fundamentallösung $H_n(\vec{r}, t)$ in n Dimensionen, welche auch als Wärmeleitungskern (heat kernel) bezeichnet wird. Im \mathbb{R}^n lautet diese mit der Temperaturleitfähigkeit a :

$$H_n(\vec{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi a t}^n} e^{-\frac{\|\vec{r}\|^2}{4at}}. \quad (118)$$

Die Allgemeinheit von n statt drei Dimensionen wird sich später als nützlich erweisen, da sich einige Beleuchtungsgeometrien auf zwei- oder sogar eindimensionale Wärmeleitungsprobleme zurückführen lassen.

Für die konstante Anfangstemperatur $u(\vec{r}, 0) = u_0$ bleibt nur noch eine Temperaturänderung, die durch den zweiten Term aus (117) hervorgerufen wird, zu berechnen. Da die Inhomogenität der PDGL $f(\vec{r}, t)$ für die Beleuchtungsdauer T konstant ist, kann die Zeitintegration direkt auf den Wärmeleitungskern angewendet werden.

Das Ergebnis der Zeitintegration ist ein neuer Faltungskern für konstante Anregung, wobei T nur noch ein Parameter ist:

$$H_{n,T}(\vec{r}) = \int_0^T H_n(\vec{r}, t) dt = \frac{T}{4\sqrt{\pi a T}^n} \sqrt{\frac{aT}{\|\vec{r}\|^2}}^{n-2} \Gamma\left(\frac{n}{2} - 1, \frac{\|\vec{r}\|^2}{4aT}\right). \quad (119)$$

Dabei kommt die Definition der unvollständigen Gammafunktion zum Einsatz:

$$\Gamma(a, z) := \int_z^\infty t^{a-1} e^{-t} dt. \quad (120)$$

Es verbleibt die räumliche Faltung der Inhomogenität der PDGL $f(\vec{x}, t)$ aus den Gleichungen (108) und (102) mit dem Wärmeleitungskern $H_{n,T}(\vec{r})$ für konstante Anregung:

$$u(\vec{r}, T) = \frac{\mu_a}{\rho c_p} \int_{\mathbb{R}^n} I_P(\vec{r}') \cdot H_{n,T}(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}' + u_0(\vec{r}). \quad (121)$$

Aus Symmetriegründen liegt die hier interessante Spitzentemperatur genau im Fokus der Beleuchtungsverteilung $I_P(\vec{r})$, also bei $\vec{r} = \vec{0}$. Dies erlaubt es, statt der Lösung des Faltungsintegrals, die spezielle Lösung des einfachen Integrals zu nutzen:

$$u(\vec{0}, T) = \frac{\mu_a}{\rho c_p} \int_{\mathbb{R}^n} I_P(\vec{r}') \cdot H_{n,T}(\vec{r}') d\vec{r}' + u_0(\vec{0}). \quad (122)$$

Eine numerische Berechnung dieses Integrals ist möglich, setzt jedoch die hier verwendete Definition der unvollständigen Gammafunktion voraus. Die Definition, die dazu z.B. in Matlab implementiert ist, lässt sich zwar prinzipiell nutzen, um die hier verwendete Definition nachzubilden, das Ergebnis existiert jedoch in den hier wichtigen Fällen nur als Grenzwert. Ein Ausweg ist dabei die separate Berechnung des Wärmeleitungskerns für konstante Anregung, für ein, zwei oder drei Dimensionen (siehe Anhang A10.).

3.4.2.1. Analytische Lösungen für die freie Diffusion

Die maximale Temperaturänderung nach der Beleuchtungsdauer T lässt sich für einige symmetrische Intensitätsverteilungen leicht analytisch berechnen.

3.4.2.1.1. Die unendliche Lichtschichtlösung der freien Diffusion

Zur Beleuchtung wird die gleiche idealisierte Lichtschicht $I_P(x, y, z) = I_{P0} \cdot \hat{I}_P(x, y, z)$ wie in Anhang A6.3. angenommen. Sie breitet sich in x-Richtung aus, ist in y-Richtung unendlich ausgedehnt und hat in z-Richtung ein von x und y unabhängiges Gauß-Profil ($w_{Pz}(x) = w_{P0z}$). Durch diese Geometrie findet Wärmeleitung nur in z-Richtung statt.

Die maximale Temperaturerhöhung ist in der Mitte der Lichtschicht zu erwarten und beträgt:

$$\begin{aligned}
 u(\vec{0}, T) - u_0(\vec{0}) &= \frac{\mu_a}{\rho c_p} \int_{-\infty}^{\infty} I_p(0,0,z) \cdot H_{1,T}(z) dz \\
 &= I_{P0} \mu_a \frac{w_{P0z}^2}{4k} \left(\sqrt{1 + \frac{8kT}{\rho c_p w_{P0z}^2}} - 1 \right). \quad (123)
 \end{aligned}$$

Das Ergebnis lässt sich für eine maximal erlaubte Temperaturerhöhung ($u_{crit} - u_0$) nach I_{P0} umstellen. Mit Gleichung (115) ergibt sich der Temperaturfaktor:

$$u_f(T) = \frac{4k}{w_{P0z}^2} \left(\sqrt{1 + \frac{8kT}{\rho c_p w_{P0z}^2}} - 1 \right)^{-1}. \quad (124)$$

3.4.2.1.2. Das kollimierte Strahlenbündel (Lichtlinie)

Zur Beleuchtung wird das gleiche idealisierte, zylinderförmige und kollimierte gaußsche Strahlenbündel $I_p(x, y, z)$ wie in Anhang A6.4. angenommen. Es breitet sich in x-Richtung aus und hat in y- und z-Richtung ein von x unabhängiges Gauß-Profil $w_{Py}(x) = w_{Pz}(x) = w_{P0}$. Es verbleibt die Wärmeleitung in Radialrichtung (in der y-z-Ebene):

$$\begin{aligned}
 u(\vec{0}, T) - u_0(\vec{0}) &= \frac{\mu_a}{\rho c_p} \iint_{-\infty}^{\infty} I_p(0, y, z) \cdot H_{2,T}(y, z) dy dz \\
 &= I_{P0} \mu_a \frac{w_{P0}^2}{8k} \ln \left(1 + \frac{8kT}{\rho c_p w_{P0}^2} \right). \quad (125)
 \end{aligned}$$

Das Ergebnis lässt sich für eine maximal erlaubte Temperaturerhöhung ($u_{crit} - u_0$) nach I_{P0} umstellen. Mit Gleichung (115) ergibt sich der Temperaturfaktor:

$$u_f(T) = \frac{8k}{w_{P0}^2} \cdot \ln \left(1 + \frac{8kT}{\rho c_p w_{P0}^2} \right)^{-1}. \quad (126)$$

Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 grafisch dargestellt.

3.4.2.2. Die Größe des Wärmeleitungskerns für konstante Anregung

Um explizit entscheiden zu können, welcher der vier Grenzfälle (ohne, freie, begrenzte Diffusion, thermisch stationärer Zustand) bei der Wärmeleitung in einer Probe zu betrachten ist, muss berechnet werden, wie weit die eingebrachte Energie während der Beleuchtungsdauer T diffundiert ist. Dazu wird der Wärmeleitungskern für konstante Anregung nach dem Ort integriert. Der Anteil $\hat{H}_{n,T}(R)/T$ von Wärme, der nach der Beleuchtungsdauer T innerhalb einer Kugel mit dem Radius R um eine punktförmige Quelle verblieben ist, ergibt sich aus:

$$\hat{H}_{n,T}(R) = \int_{\|\vec{r}\| < R} H_{n,T}(\vec{r}) d\vec{r} . \quad (127)$$

Die Lösungen für ein bis drei Dimensionen sind in Anhang A11. gegeben. Allgemein gilt:

$$\lim_{R \rightarrow \infty} \hat{H}_{n,T}(R) = T . \quad (128)$$

Der Radius R , welcher als Maß für die Größe des Wärmeleitungskerns gilt, ist für einen bestimmten Anteil A an Wärme innerhalb der Kugel mit dem Radius R implizit gegeben durch:

$$\frac{\hat{H}_{n,T}(R_K)}{T} = A . \quad (129)$$

Aufgrund des streng monoton steigenden Verhaltens von $\hat{H}_{n,T}(R)$ lässt sich die Gleichung für verschiedene T mit dem Parameter A durch Bisektion lösen.

Das Ergebnis für $R(T)$ liefert für A nahe 1 das Kriterium, um die vier Grenzfälle der Wärmeleitung zu unterscheiden:

- 1.) **Ohne Diffusion:** $R(T) \ll$ räumliche Feature in der Beleuchtung $I_p(\vec{r})$
- 2.) **Freie Diffusion:** $R(T) \ll l$
- 3.) **Begrenzte Diffusion:** $R(T) \approx l$
- 4.) **Thermisch stationärer Zustand:** $R(T) \gg l$

Dabei ist $2l$ die Kantenlänge der würfelförmigen Probe im Wärmebad (siehe Abbildung 27).

3.4.2.3. Numerische Lösungen für die freie Diffusion

Numerisch lässt sich das inhomogene Cauchy-Problem für unbegrenzte Proben komplett lösen. Um die zugrunde liegende Faltung aus Gleichung (117) mit dem Wärmeleitungskern numerisch schnell zu berechnen ist es sinnvoll, das Faltungstheorem für die Fourier-Transformation anzuwenden. Wird wieder ausgenutzt, dass die Maximaltemperatur im Fokus der Beleuchtung zu finden ist, genügt es das Integral aus Gleichung (122) numerisch zu berechnen. Dazu ist es notwendig, die Integralgrenzen ins endliche zu legen und den Träger der Beleuchtungsfunktion und des Wärmeleitungskerns durch eine Abtastung zu diskretisieren.

Das Integrationsgebiet muss dabei so groß gewählt werden, dass nur ein geringer Teil der Wärmeenergie dessen Grenzen übertritt (z.B. < 5%). Dazu muss das Integrationsgebiet mit der Kantenlänge $2L$ (nicht zu verwechseln mit der Probengröße $2l$, die hier keine Rolle spielt) in jeder Dimension mindestens doppelt so groß sein, wie der Radius R des Wärmeleitungskerns aus Gleichung (129), wobei der Anteil A sehr nahe 1 gewählt wird (z.B. 95%):

$$L \geq R . \quad (130)$$

Als Kriterium für die örtliche Abtastfrequenz kann generell das Nyquist-Shannon-Abtasttheorem verwendet werden, wonach die Abtastfrequenz doppelt so hoch sein muss, wie die höchste auftretende Frequenz im Signal. Dieses Kriterium kann für die gaußförmige Beleuchtung näherungsweise erfüllt werden, wenn die Pixelgröße px stets kleiner als der Tailenradius w_{p0} gewählt wird:

$$px \leq w_{p0} . \quad (131)$$

Da der Wärmeleitungskern für zeitlich konstante Anregung in der Mitte eine Singularität aufweist, kann das Abtasttheorem nicht ohne weiteres angewendet werden. Die Abtastung kann jedoch so gewählt werden, dass die Singularität genau zwischen 2 (in 1D), 4 (in 2D) oder 8 (in 3D) Abtastpunkte fällt. Numerische Fehler bleiben klein, wenn die Größe eines Pixels px kleiner als der Radius R_Z des Zentrums des Wärmeleitungskernes ist:

$$px \leq R_Z . \quad (132)$$

Der Radius R_Z ergibt sich ebenfalls aus Gleichung (129), wobei diesmal der Anteil A sehr klein gewählt wird (z.B. 1%).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 grafisch dargestellt.

3.4.3. Die Temperaturverteilung im thermisch stationären Zustand

In einer endlich ausgedehnten Probe im Wärmebad erreicht nach langer Beleuchtungsdauer ($T \rightarrow \infty$) die Temperaturverteilung für jede Beleuchtungsgeometrie einen thermisch stationären Zustand. Aus der inhomogenen Wärmeleitungsgleichung wird im stationären Zustand die inhomogene Poisson-Gleichung:

$$-a\nabla^2 u(\vec{r}) = f(\vec{r}) . \quad (133)$$

Diese lässt sich für bestimmte Spezialfälle auf wenige Dimensionen reduzieren und leicht analytisch lösen (siehe dazu Anhang A12.).

3.4.4. Die begrenzte Diffusion

Die Finite-Elemente-Methode (FEM) als ein numerisches Lösungsverfahren ist geeignet, um auch bei dieser Problemstellung Lösungen für verschiedene Beleuchtungsgeometrien zu finden. Für Matlab ist eine FEM-Bibliothek mit dem Namen: „Partial Differential Equation Toolbox“ (PDE) mit umfangreicher Dokumentation verfügbar [93]. Diese löst elliptische (z.B. Poisson-Gleichungen), parabolische (z.B. Wärmeleitungsgleichungen) und hyperbolische (z.B. Wellengleichungen) partielle Differentialgleichungen. Die folgenden Beschreibungen beziehen sich auf die 2D PDE-Toolbox der Matlab Version 2010b, sind jedoch laut Matlab-Hilfe bis mindestens 2016a kompatibel.

Jedes PDGL-Problem wird in der Toolbox durch einen Satz an Parametern⁷ für Geometrie, Randbedingungen, Triangulation und die Differentialgleichung selbst beschrieben. Die elliptische PDGL ist dabei definiert als:

$$-\nabla \cdot (c\nabla u) + au = f. \quad (134)$$

Die Parameter zur Lösung des Wärmeleitungsproblems im thermisch stationären Zustand sind in Tabelle 8 gegeben.

Tabelle 8: Parameter der elliptischen partiellen Differentialgleichung in Matlab zur Lösung des Wärmeleitungsproblems im thermisch stationären Zustand

Parameter	Wert	Bedeutung
g	'squareg'	Beschreibung der Probengeometrie hier: quadratisch $x = [-1 \ 1]; y = [-1 \ 1]$
b	'squareb1'	Randbedingungen hier: Dirichlet, $u = 0$
c	[1; 0; 0; 1]	$\frac{\partial^2}{\partial x^2}, \frac{\partial^2}{\partial y \partial x}, \frac{\partial^2}{\partial x \partial y}, \frac{\partial^2}{\partial y^2}$
a	0	Hier nicht nötig
f	$I_p \cdot \frac{\mu_a}{k} \cdot l^2$	Inhomogenität (trianguliert) bestehend aus: gaußschem Strahl $I_p(x, 0, z)$ für Ebene im Lichtkeil bzw. $I_p(x, y, 0)$ für Ebene im niedrig NA Lichtbündel wobei: $I_p(0,0,0) = 1$, Materialkonstanten $\mu_a = 1$ und $k = 0,6 \text{ W}/(\text{m} \cdot \text{K})$ und der halben Kantenlänge der quadratischen Probe: l
u	Ergebnis	Temperaturunterschied im stationären Zustand $u - u_0$

⁷ Die Bezeichnung der Parameter erfolgt hier nach der Definition in der FEM-Bibliothek aus Matlab. Sie dürfen nicht mit bisher diskutierten physikalischen Größen verwechselt werden.

Die parabolische PDGL ist dabei definiert als:

$$d \frac{\partial u}{\partial t} - \nabla \cdot (c \nabla u) + au = f. \quad (135)$$

Die Parameter zur Lösung des Wärmeleitungsproblems für die begrenzte Diffusion sind in Tabelle 9 gegeben.

Tabelle 9: Parameter der parabolischen partiellen Differentialgleichung in Matlab zur Lösung des Wärmeleitungsproblems für die begrenzte Diffusion

Parameter	Wert	Bedeutung
u0	Nullvektor	Anfangswerte zum Zeitpunkt $t = 0$ für jeden Punkt p
b	'squareb1'	Randbedingungen hier: Dirichlet, $u = 0$
p	Delaunay-Triangulierung	Netzdaten: Punktematrix
e	Delaunay-Triangulierung	Netzdaten: Kantenmatrix (Verbindungen zwischen Punkten)
t	Delaunay-Triangulierung	Netzdaten: Dreieckematrix (Zugehörigkeit der Punkte zu Dreiecken)
c	[1; 0; 0; 1]	$\frac{\partial^2}{\partial x^2}, \frac{\partial^2}{\partial y \partial x}, \frac{\partial^2}{\partial x \partial y}, \frac{\partial^2}{\partial y^2}$
a	0	Hier nicht nötig
f	$I_p \cdot \frac{\mu_a}{k} \cdot l^2$	Inhomogenität (wie in Tabelle 8)
d	$\frac{\rho c_p}{k} \cdot l^2$	Materialkonstanten: ρ, c_p und k , halbe Kantenlänge der quadratischen Probe: l
u	Ergebnis	Temperaturunterschied $u - u_0$ nach der Zeit T

Nach der Definition eines quadratischen Grundgebiets der Probe wird dieses für die numerische Behandlung in ein Netz aus Dreiecken zerlegt. Eine gleichmäßige Abdeckung durch Delaunay-Triangulierung kann in Matlab mit den Befehlen `initmesh` und `refinemesh` erfolgen. Wünschenswert ist jedoch ein Netz, welches adaptiv so der Lösung angepasst ist, dass numerische Fehler gleichmäßig klein bleiben. Ein solches Netz müsste in der Nähe des Fokus besonders kleine Dreiecke aufweisen und kann am Rand gröber werden. Von der Funktion `adaptmesh` aus der FEM-Bibliothek kann ein optimiertes Netz zusammen mit der Lösung u einer elliptischen PDGL gefunden werden. Das Ergebnis dieser Triangulierung sind Listen aus Punkten (Parameter p), Kanten (Parameter e) und Dreiecken (Parameter t). Die Lösung u beinhaltet die Temperaturverteilung im stationären Zustand (nach langer Zeit T). Der Matlab-Befehl lautet:

```
[u,p,e,t]=adaptmesh(g,b,c,a,f,'Ngen',100,'tripick','circlepick',
'maxt',100000,'par',1E-14);
```

Neben den in der Tabelle 8 erläuterten, physikalischen Parametern werden zusätzliche numerische Parameter zur Steuerung des iterativen Algorithmus übergeben (Tabelle 10).

Tabelle 10: Parameter zur Steuerung des iterativen Algorithmus „adaptmesh“

Parameter	Wert	Bedeutung
'Ngen'	100	Maximale Anzahl an Triangulierungsgenerationen
'tripick'	'circlepick'	Algorithmus zur Dreiecksauswahl 'circlepick': Selektiert Dreiecke anhand einer absoluten Toleranz 'par'
'maxt'	100000	Maximale Anzahl an neuen Dreiecken
'par'	1E-10 bis 1E-14	Maximal erlaubte absolute Toleranz in Einheiten der Lösung u in Kelvin

Die Parameter sind dabei stets so gewählt, dass eine komplette Adaption an die maximal erlaubte Toleranz erfolgen kann (Parameter für 'Ngen' und 'maxt' werden also hinreichend hoch gewählt). Anderenfalls würde gerade im Fokus, mit seinem hohen Intensitätsgradienten, die Verfeinerung nicht zu Ende geführt. Die absolute Toleranz (Parameter 'par') wird wiederum relativ zum Maximum $u(0,0)$ des erwarteten Ergebnisses festgelegt. Auf diese Weise können auch große Proben durch wenige Dreiecke so diskretisiert werden, dass ein kleiner Fokus ausreichend fein abgetastet wird (siehe Abbildung 28).

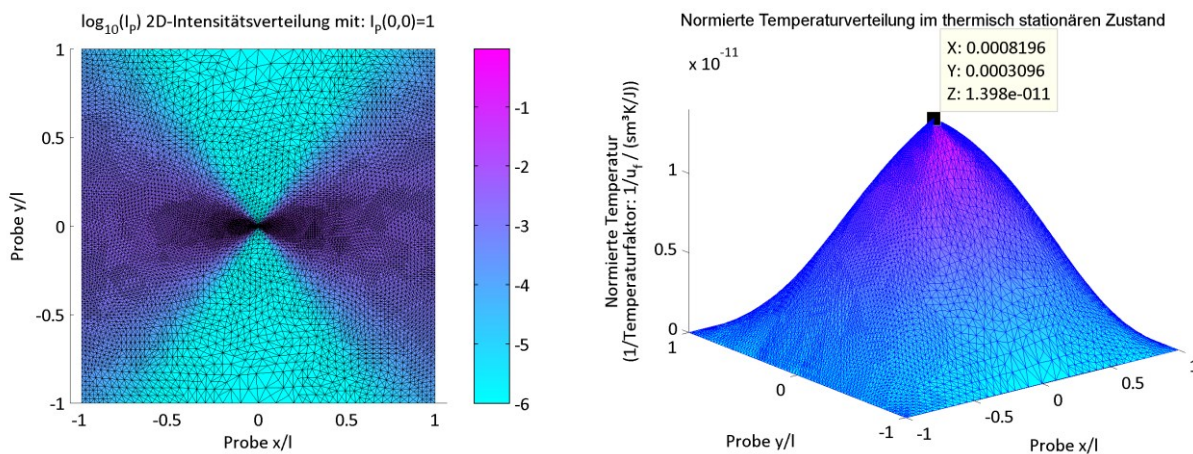


Abbildung 28: Beleuchtung und Temperatur einer $l = 100 \mu\text{m}$ Probe in einem linienkonfokalen Mikroskop, links: triangulierte Intensitätsverteilung (log) in 2D eines Gauß-Strahls mit 0,8 NA und Ausbreitungsrichtung in x , rechts: normierte Temperaturverteilung im thermisch stationären Zustand. Da $\mu_a = 1$ gewählt wurde, ergibt der Kehrwert des Maximums bei $x = y = 0$ den Temperaturfaktor u_f .

Nach der Definition des Gitters, kann dieses auch für die parabolische Wärmeleitungsgleichung verwendet werden. Die Lösung u beinhaltet die Temperaturverteilung zu den in 'tlist' angegebenen Zeitpunkten (Abbildung 29). Der Matlab-Befehl mit den Parametern aus Tabelle 9 lautet:

```
u = parabolic(u0,tlist,b,p,e,t,c,a,f,d);
```

Mit Hilfe des in Gleichung (115) eingeführten Temperaturfaktors $u_f(T)$ lassen sich die Ergebnisse interpretieren als:

$$u(\vec{r}, T) = I_P(\vec{r})\mu_a \frac{1}{u_f(\vec{r}, T)} + u_0(\vec{r}). \quad (136)$$

Durch die Normierung der Intensitätsverteilung und die Wahl von $\mu_a = 1$, ergibt der Kehrwert des Maximums der Lösung $u(\vec{r}, T)$ bei $x = y = 0$ direkt den Temperaturfaktor $u_f(T)$.

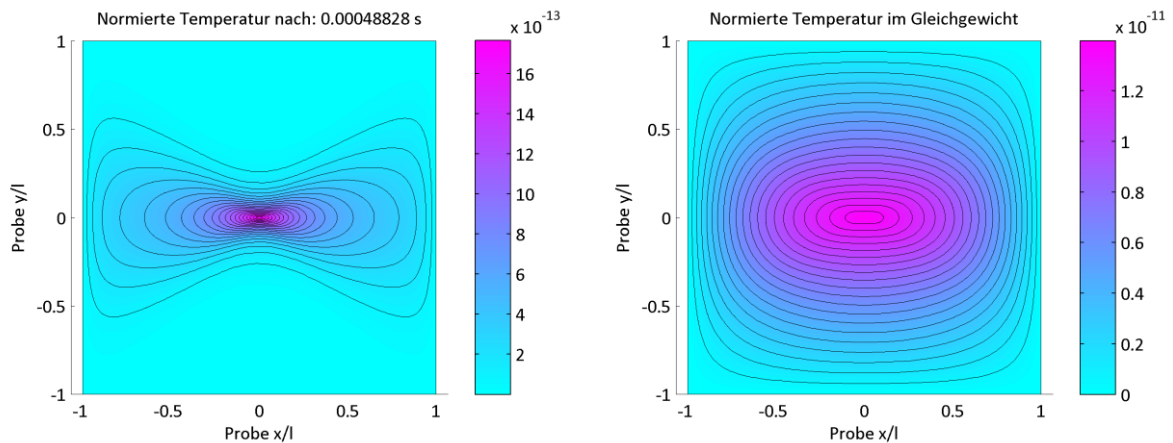


Abbildung 29: Normierte Temperaturverteilung in einer $l = 100 \mu\text{m}$ Probe in einem linienkonfokalen Mikroskop, links: nach $488 \mu\text{s}$, rechts: im thermisch stationären Zustand.

3.4.5. Vergleich der Temperaturfaktoren verschiedener Beleuchtungsgeometrien

Die bisher diskutierten Lösungsverfahren erlauben es, die Temperaturfaktoren $u_f(T)$ für die Beleuchtungsgeometrien (Anhang A5.) in allen vier Grenzfällen (ohne, freie, begrenzte Diffusion, thermisch stationärer Zustand) zu berechnen. Die Ergebnisse unterschiedlich großer Wasserproben sind in Abbildung 30 grafisch dargestellt. Die Parameter für die gaußförmige Beleuchtung sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Wellenlänge der Beleuchtung und die Eigenschaften einer Wasserprobe sind gegeben mit:

ρ	Dichte der Probe:	998 kg/m^3 [34],
c_p	spezifische Wärmekapazität:	$4190 \text{ J}/(\text{kg} \cdot \text{K})$ [34],
k	Wärmeleitfähigkeit:	$0,6 \text{ W}/(\text{m} \cdot \text{K})$ [92],
n	Brechungsindex:	$1,333$ [34],
λ	Wellenlänge der Beleuchtung:	550 nm .

Tabelle 11: Definition der Beleuchtungsgeometrien (vergleiche auch Anhang A5.)

Beleuchtungsgeometrie	w_{p0x}	w_{p0y}	w_{p0z}
Konfokal	$0,8 NA \rightarrow 175 nm$	$0,8 NA \rightarrow 175 nm$	Ausbreitungsrichtung
Linienkonfokal	$\rightarrow \infty$	$0,8 NA \rightarrow 175 nm$	Ausbreitungsrichtung
Lichtschicht	Ausbreitungsrichtung	$\rightarrow \infty$	$w_{pz}(x) = 2,5 \mu m$
Lichtlinie	Ausbreitungsrichtung	$w_{py}(x) = 2,5 \mu m$	$w_{pz}(x) = 2,5 \mu m$
Weitfeld	$\rightarrow \infty$	$\rightarrow \infty$	Ausbreitungsrichtung

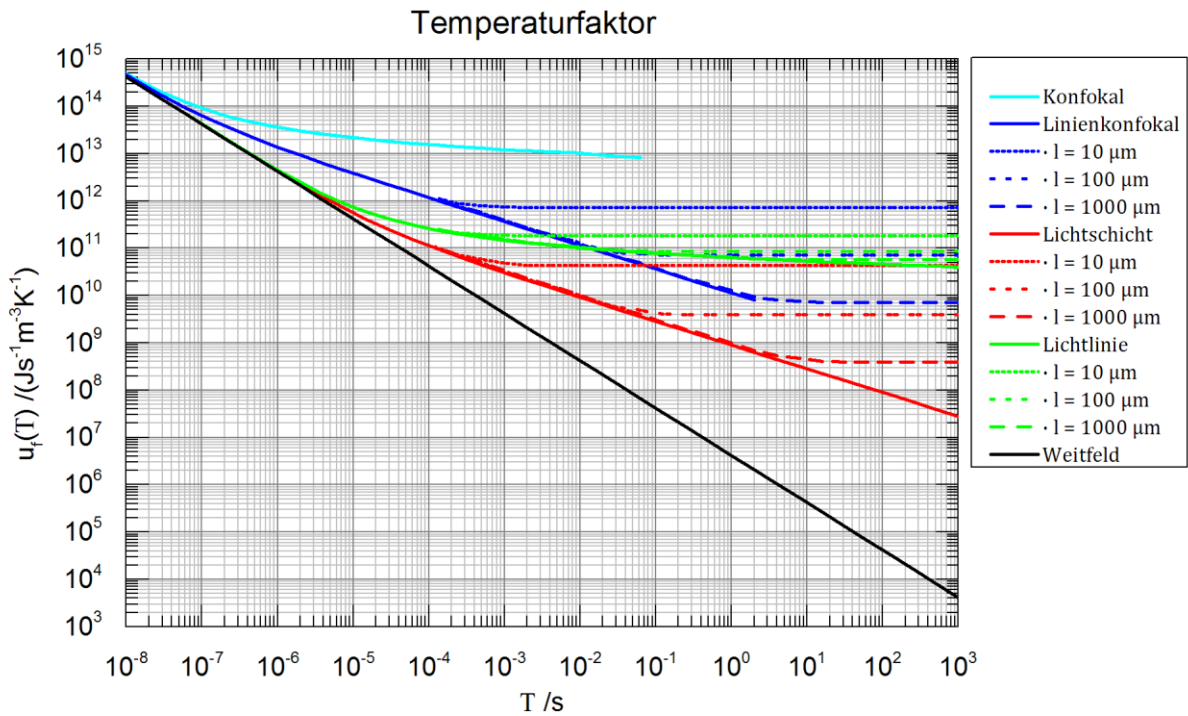


Abbildung 30: Temperaturfaktor u_f in Abhängigkeit der Beleuchtungsdauer T . Durchgezogene Linien gelten für unendlich ausgedehnte Proben, gestrichelte Linien für Proben mit der Kantenlänge $2l \times 2l \times \infty$ bei Linienkonfokal und Lichtlinie und $2l \times \infty \times \infty$ bei Lichtschicht. Die Ergebnisse für endliche Proben sind mit Hilfe der FEM errechnet. Die Ergebnisse für unendliche Proben von Weitfeld-, Lichtschicht- und Lichtlinienmikroskop sind analytisch, für Konfokal- und Linienkonfokalmikroskop numerisch berechnet. Die analytisch gefundenen thermisch stationären Zustände für die Lichtschicht und das kollimierte Strahlenbündel (Kapitel 3.4.3.) stimmen mit denen der FEM überein.

3.5. Vergleich verschiedener Mikrospektrometertypen

Die Signalausbeute der Mikroskopgeometrie (Kapitel 3.1.), das erreichbare SNR des Spektrometers (Kapitel 3.2.) und das Maß für die maximale Beleuchtung der Probe (Kapitel 3.4.) erlauben eine quantitative Aussage über die erreichbare Signalqualität eines Mikrospektrometers bei einer vorgegebenen totalen Messzeit \hat{T} zu treffen. Das SNR des hyperspektralen Bildes ist durch Gleichung (96), (86) und (88) gegeben:

$$SNR_B = SNR_f \cdot \sqrt{L \cdot \Omega \cdot \Delta v} \cdot \sqrt{A} \cdot \sqrt{\hat{T} \cdot n_z^{-1}}. \quad (137)$$

Für den Fall, dass die numerische Apertur des Spektrometers größer oder gleich der rückseitigen numerischen Apertur des Mikroskops ist, was sich in der Regel realisieren lässt, steht das gesamte Signal des Mikroskops J dem Spektrometer zur Verfügung. Es lässt sich somit folgende Identifikation treffen:

$$L \cdot \Omega \cdot \Delta v = J. \quad (138)$$

Zusammen mit Gleichung (79) ist das SNR des hyperspektralen Bildes demnach gegeben mit:

$$SNR_B = SNR_f \cdot \sqrt{I_{P0}} \cdot \sqrt{\sigma_R \cdot N_A \cdot c} \cdot \sqrt{J_f} \cdot \sqrt{A} \cdot \sqrt{\hat{T} \cdot n_z^{-1}}. \quad (139)$$

Diese Beschreibung geht noch davon aus, dass es unabhängig von der Beleuchtungsgeometrie eine bestimmte, erlaubte Intensität I_{P0} gibt, mit der die Probe maximal beleuchtet werden darf.

Das Kapitel 3.4. hat jedoch gezeigt, dass die Wärmeentwicklung zu einer Abhängigkeit der maximal erlaubten Intensität $I_{P0}(T)$ von der Beleuchtungsdauer T führt, die charakteristisch für die Beleuchtungsgeometrie ist. Diese Spitzenintensität ist in Gleichung (115) auf den beleuchtungsgeometrieabhängigen Temperaturfaktor $u_f(T)$ zurückgeführt. Für das SNR des hyperspektralen Bildes ergibt sich:

$$SNR_B = SNR_f \cdot \sqrt{\frac{u_{crit} - u_0}{\mu_a}} \cdot \sqrt{u_f(T)} \cdot \sqrt{\sigma_R \cdot N_A \cdot c} \cdot \sqrt{J_f} \cdot \sqrt{A} \cdot \sqrt{\hat{T} \cdot n_z^{-1}}. \quad (140)$$

Das gewählte Verfahren zur hyperspektralen Bildgebung gibt den Zusammenhang zwischen der totalen Messzeit \hat{T} für ein hyperspektrales 3D-Bild und der Beleuchtungsdauer T an einer Stelle der Probe vor (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen der totalen Messzeit \hat{T} für ein hyperspektrales 3D-Bild und der Beleuchtungsdauer T an einer Stelle der Probe (für die Belichtungszeit τ vergleiche auch Anhang A8.)

Methode örtlicher Codierung	Beleuchtungsdauer T
Punktweise	$T = \tau = \frac{\hat{T}}{n_x n_y n_z}$
Linienweise	$T = \tau = \frac{\hat{T}}{n_y n_z}$
Rahmenweise	$T = T = \frac{\hat{T}}{n_z}$
Fensterweise	$T = \tau \cdot n_v = \frac{\hat{T} \cdot n_j}{n_z n_y + n_j}$

Da viele Parameter aus Gleichung (140) unabhängig vom verwendeten Mikrospektrometer sind, ist es sinnvoll, einen neuen SNR-Faktor für Mikrospektrometer $SNR_{fM}(\hat{T})$ einzuführen, der parametrisch von der totalen Messzeit \hat{T} abhängt:

$$SNR_B = SNR_{fM}(\hat{T}) \cdot \sqrt{\frac{u_{crit} - u_0}{\mu_a}} \cdot \sqrt{\sigma_R \cdot N_A \cdot c} \cdot \sqrt{A} \cdot \sqrt{n_z^{-1}}, \quad (141)$$

mit:

$$SNR_{fM}(\hat{T}) = SNR_f \cdot \sqrt{u_f(T) \cdot J_f \cdot \hat{T}}. \quad (142)$$

Zur Übersicht sind hier noch einmal alle Parameter mit deren SI-Einheiten angegeben:

SNR_B	SNR für das hyperspektrale Bild:	\sqrt{J} ,
$SNR_{fM}(\hat{T})$	SNR-Faktor für Mikrospektrometer:	$\sqrt{J \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}}$,
SNR_f	SNR-Faktor des bildgebenden Spektrometers (Tabelle 7):	1,
u_{crit}	Temperatur der Zerstörschwelle:	K ,
u_0	Umgebungstemperatur:	K ,
μ_a	Absorptionskoeffizient:	m^{-1} ,
$u_f(T)$	Temperaturfaktor (Kap. 3.4.):	$J \cdot s^{-1} \cdot m^{-3} \cdot K^{-1}$,
σ_R	Raman-Streuquerschnitt (für ein Molekül):	m^2 ,
N_A	Avogadrokonstante:	mol^{-1} ,
c	Konzentration der Raman-Streuer:	$mol \cdot m^{-3}$,
J_f	Signalfaktor für die Mikroskopgeometrie (Anhang A6.):	m ,
A	Detektionsfläche für einen Pixel:	m^2 ,
\hat{T}	totale Messzeit eines hyperspektralen 3D-Bildes:	s ,
n_x, n_y, n_z	Anzahl der örtlichen Abtastwerte in x-,y-,z-Richtung:	1,
n_v	Anzahl der spektralen Abtastwerte:	1.

Mit diesem Wissen ist es möglich, verschiedene Mikrospektrometer unter den gleichen Voraussetzungen, vor dem Hintergrund einer schnellen Vermessung biologischer Gewebe, miteinander zu vergleichen. Bevor die Ergebnisse dieses Vergleichs vorgestellt werden, soll der SNR-Faktor für Mikrospektrometer am Beispiel eines Weitfeldmikroskops mit veränderlichem Bandfilter (rahmenweises Abtasten) aus den Teilfaktoren zusammengesetzt werden.

3.5.1. Beispiel: Weitfeldmikroskop mit veränderlichem Bandfilter

Der SNR-Faktor für Mikrospektrometer $SNR_{fM}(\hat{T})$ ist gegeben durch Gleichung (142). Der SNR-Faktor SNR_f für rahmenweise abtastende und filterbasierte bildgebende Spektrometer ist in Tabelle 7 gegeben:

$$SNR_f = \frac{1}{\sqrt{1 + q_S^2}} \sqrt{\frac{\eta}{n_v n_z}}. \quad (143)$$

Für eine idealisierte Weitfeldbeleuchtung findet keine Wärmeleitung statt und somit kann der Temperaturfaktor $u_f(T)$ aus Kapitel 3.4.1. zusammen mit der Beleuchtungsdauer T aus Tabelle 12 verwendet werden:

$$u_f(\hat{T}) = \frac{\rho c_p n_z}{\hat{T}}. \quad (144)$$

Der Signalfaktor für die Mikroskopgeometrie J_f ist in Anhang A6.5. gegeben:

$$J_f = 2 \frac{\lambda n}{NA^2}. \quad (145)$$

Zur Bestimmung des Rauschfaktors q_S ist zu berücksichtigen, dass ein Weitfeldmikroskop zusätzliches Licht aus nicht fokussierten Bereichen der Probe sammelt, welches zum Schrottrauschen beiträgt. Für die Näherung einer nicht verarmenden Anregung ist dieses zur Probenhöhe Δz proportional (Anhang A6.5.):

$$J_{fg} = J_f \cdot q_M = \Delta z. \quad (146)$$

Unter Vernachlässigung des Dunkelrauschens des Detektors lässt sich der Rauschfaktor q_S des Spektrometers mit dem Anteil des fokusfernen Lichtes $q_M - 1$ identifizieren:

$$q_S = q_M - 1. \quad (147)$$

Aus Gleichung (147), (146) und (145) ergibt sich:

$$q_S = \Delta z \cdot \frac{NA_D^2}{2\lambda n} - 1. \quad (148)$$

Der vergleichsfähige SNR-Faktor für Mikrospektrometer $SNR_{fM}(\hat{T})$ ist demnach für Weitfeldmikroskope mit veränderlichem Bandfilter als bildgebendes Spektrometer gegeben durch:

$$SNR_{fM}(\hat{T}) = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\Delta z \cdot \frac{NA_D^2}{2\lambda n} - 1\right)^2}} \cdot \sqrt{\frac{\eta}{n_v} \cdot q_{c_p} \cdot \frac{2\lambda n}{NA_D^2}}. \quad (149)$$

Bemerkenswert dabei ist, dass das Ergebnis unabhängig von der totalen Messzeit \hat{T} ist.

3.5.2. Ergebnisse des Vergleichs

Wie in Kapitel 3.5.1. lassen sich auch für andere Mikrospektrometer die SNR-Faktoren berechnen. Das Ergebnis für sechs verschiedene Kombinationen aus Beleuchtungsgeometrie und bildgebendem Spektrometer ist in Abbildung 31 grafisch dargestellt. Die gewählten Parameter beschreiben dabei ein hyperspektrales 2D-Bild aus 1000×1000 Pixeln mit 1000 Spektralkanälen. Verluste innerhalb der Spektrometer sind vernachlässigt ($\eta = 1$). Sie würden anderenfalls den SNR_{fM} um einen konstanten Faktor $\sqrt{\eta}$ verändern (vergleiche Tabelle 7). Ebenfalls vernachlässigt ist das Schrotrauschen des Lichts, welches außerhalb des Fokus gestreut wird (relevant für Weitfeldbeleuchtung) und das Dunkelrauschen des Detektors ($q_S = 0$). Dieses signalunabhängige Rauschen ließe sich durch den Rauschfaktor q_S aus Gleichung (99) berücksichtigen. Angenommen wurde eine überwiegend wässrige Probe mit geringer Absorption, eine Beleuchtung bei 550 nm und ein 0,8 NA Objektiv zur Detektion. Die entsprechenden Temperaturfaktoren u_f sind in Abbildung 30 angegeben.

Die Graphen in Abbildung 31 zeigen qualitativ drei verschiedene Anstiegsgeschwindigkeiten:

- 1.) $SNR_{fM} = konst.$: Ohne Wärmediffusion ist die erreichbare Signalqualität unabhängig von der totalen Messzeit \hat{T} (Weitfeldmikroskop).
- 2.) $SNR_{fM} \propto \sqrt[4]{\hat{T}}$: Wärme kann nur in einer Raumdimension diffundieren (Lichtschicht und Linienkonfokal).
- 3.) $SNR_{fM} \propto \sqrt{\hat{T}}$: Wärme kann in zwei Raumdimensionen diffundieren (Konfokal- oder Lichtlinienmikroskop) oder es ist der thermisch stationäre Zustand erreicht (eine endliche Probe nach langer Zeit wird über eine Oberfläche gekühlt).

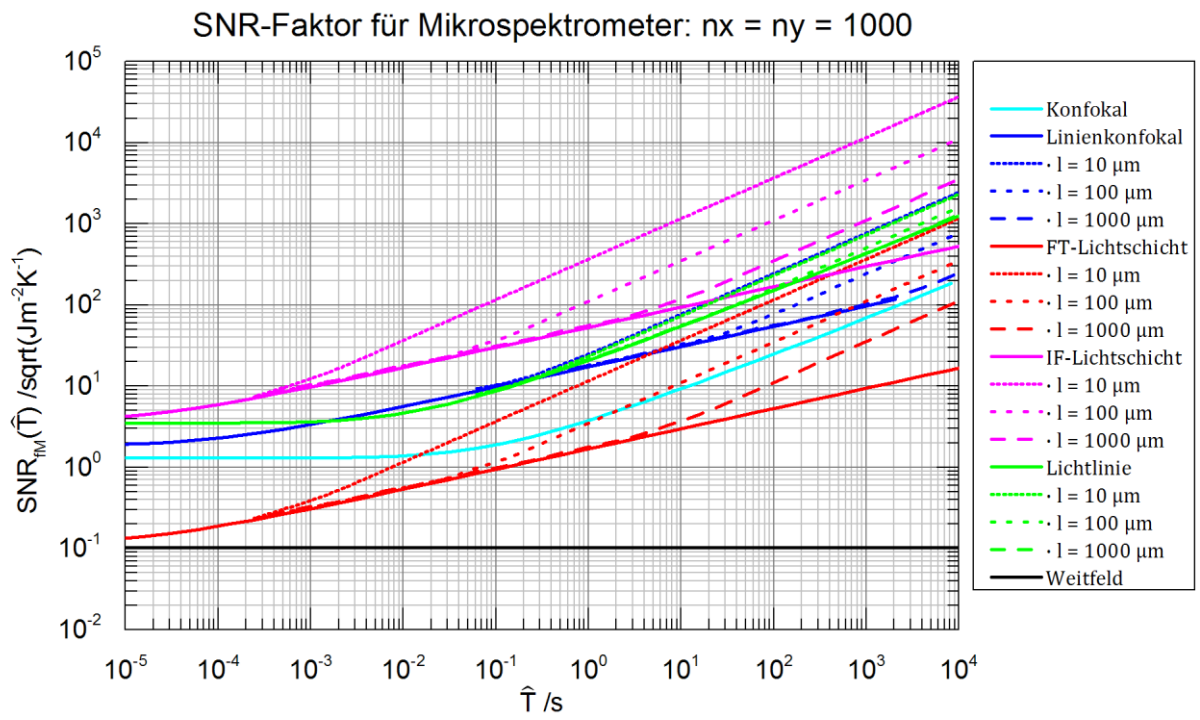


Abbildung 31: SNR-Faktor für Mikrospektrometer in Abhängigkeit der totalen Messzeit \hat{T} für 1000×1000 Bildpunkte und 1000 Spektralkanäle. Durchgezogene Linien gelten für unendlich ausgedehnte Proben, gestrichelte Linien für Proben mit der Kantenlänge $2l \times 2l \times \infty$ bei Linienkonfokal und Lichtlinie und $2l \times \infty \times \infty$ bei Lichtschicht. Das konfokale, linienkonfokale und Lichtlinienmikroskop ist mit einem dispersiven punkt- bzw. zeilenweise abtastenden Spektrometer gekoppelt. Das Lichtschichtmikroskop ist zum einen an ein (interferometrisches) Fourier-Transformations-Spektrometer (FT) wie in Kapitel 2., zum anderen an ein (panchromatisches) integrales Feldspektrometer (IF) gekoppelt. Das Weitfeldmikroskop ist an ein veränderliches Bandfilter gekoppelt. Detektorrauschen und Rauschen von nicht fokussiertem Licht wurde vernachlässigt ($q_s = 0$).

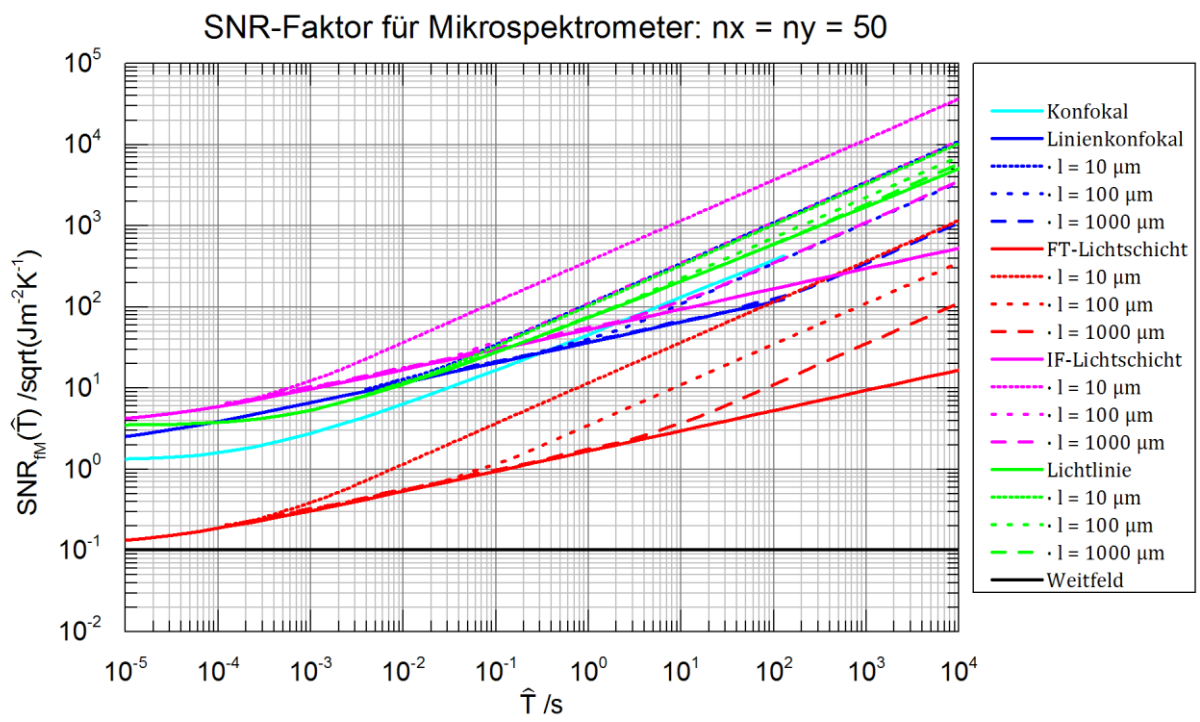


Abbildung 32: wie Abbildung 31, jedoch für 50×50 Bildpunkte

3.6. Diskussion

Der praktische Vergleich aus Kapitel 2.8. eines bildgebenden Fourier-Transformations-Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers ($n_y = 2048$ Spektralkanäle, $n_x n_y = 4 \cdot 10^6$ Pixel, ein Ausgang) mit einem dispersiven, konfokalen Raman-Mikrospektrometer ergab einen 5,3-fachen Geschwindigkeitsgewinn. Der theoretische Vergleich in Abbildung 31 ist unter anderen aber vergleichbaren Bedingungen erfolgt (Konfokal und FT-Lichtschicht). Die vierfach höhere Pixelzahl, für die das konfokale Mikrospektrometer viermal länger benötigt, wird durch die doppelte Spektralkanalzahl und den einzelnen Ausgang ($\eta = 0.5$) des FT-Spektrometers kompensiert.

Nach Abbildung 31 benötigt ein konfokales Mikroskop, um ein $SNR_{fM} = 100$ zu erreichen, 2300 s. Ein Fourier-Transformations-Spektrometer mit Lichtschichtbeleuchtung benötigt bei einer 200 μm hohen Probe für das gleiche Bild in der gleichen Qualität 800 s (1/2,9) und bei einer Probenhöhe von 20 μm nur 75 s (1/31). Bemerkenswert ist dabei, dass die Größenordnung des experimentell ermittelten Geschwindigkeitsgewinns für tiefe Gewebeschichten übereinstimmt. Überraschend ist die starke Abhängigkeit von der Probenhöhe l .

Das Diagramm aus Abbildung 31 erlaubt zusätzlich Vorhersagen über bislang nicht experimentell erforschte Mikrospektrometer. Sehr vielversprechend erscheint die Kombination der Lichtschichtbeleuchtung mit einem (panchromatischen) integralen Feldspektrometer (IF-Lichtschicht). Diese Spektrometer sortieren Licht eines ganzen Bildfeldes gleichzeitig nach Ort und Wellenlänge [75]–[77]. Für dieses Beispiel müsste jedoch ein Detektor mit mindestens 10^9 Pixeln und eine äußerst leistungsfähige Abbildungsoptik zur Verfügung stehen. Technisch realisierbar ist das Verfahren daher eher für Bilder mit wenigen Pixeln. Die SNR-Faktoren für 50×50 Pixel sind in Abbildung 32 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sequenziell abtastende Mikroskope deutlich an Geschwindigkeit aufholen, während die SNR-Faktoren der fensterweise abtastenden Spektrometer unverändert bleiben. Für dünne Proben verspricht der IF-Lichtschichtansatz einen 70-fachen Geschwindigkeitsgewinn gegenüber einem konfokalen Mikroskop. Eine während dieser Doktorarbeit betreute Masterarbeit beschäftigt sich mit der Planung eines Lichtschicht-Integral-Feld-Raman-Mikrospektrometers [77].

Besser verstehen lässt sich nun das Zitat aus [16] in der Einführung bezüglich linienkonfokaler Mikrospektrometer. Die Graphen zeigen tatsächlich für große und dünne Proben einen 100-fachen Geschwindigkeitsgewinn (Abbildung 31). Die Schlussfolgerung, dass der Geschwindigkeitszuwachs direkt an den Grad der Parallelisierung gekoppelt ist, ist jedoch falsch. Ein 1000-facher Geschwindigkeitsgewinn wäre anderenfalls zu erwarten. Abbildung 32 zeigt, dass für kleine Gewebeproben die Arbeitsgeschwindigkeit des linienkonfokalen Mikroskops sogar hinter das (isotrop) konfokale zurückfallen kann.

Unabhängig von der Probengröße ist der vielversprechendste Ansatz eine Lichtlinienbeleuchtung zusammen mit einem zeilenweise abtastenden, dispersiven Spektrometer. Hier wird die Probe kaum unnötig außerhalb des momentanen Abtastbereichs beleuchtet, die Wärme kann in zwei Dimensionen abfließen und das dispersive Spektrometer codiert das Licht vor dem Hintergrund des Schrotrauschens der Photonen optimal. Es bleibt jedoch zu beachten, dass dieses Verfahren nur für sehr transparente Proben geeignet ist und die Fähigkeit optische Schnitte anzufertigen (z-Auflösung) mit der Größe der Probe sinkt.

Hohe Abtastgeschwindigkeiten lassen Mikrospektrometer thermisch in einen anderen, parallelisierteren Spektrometertypen übergehen. Ein konfokales Mikrospektrometer geht thermisch in ein linienkonfokales über, wenn eine Zeile sehr schnell oder sogar sehr schnell mehrfach abgetastet wird. Technisch mag die Auslesegeschwindigkeit des Zeilensensors eines punktwise abtastenden Spektrometers begrenzt sein, weshalb die Abtastfrequenz eines konfokalen Mikrospektrometers limitiert bleibt. Jedoch ließe sich das mehrfache Abtasten einer Zeile auch rein optisch mit einem scan-descan-rescan-Ansatz lösen. Dabei käme ein 2D-Sensor zum Einsatz, welcher nach jeder mehrfach abgetasteten Zeile nur ein einziges Mal ausgelesen werden muss. Auf diese Weise ließen sich die Vorteile des isotropen Pinholes eines konfokalen Mikrospektrometers mit den thermischen Vorteilen eines linienkonfokalen verbinden. Bei deutlicher Erhöhung der Bestrahlungsstärke ($10^4 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$) ist zu berücksichtigen, dass der Lawinendurchbruch zu einem relevanten Zerstörmechanismus werden kann.

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus Kapitel 3.5. (Abbildung 31 und Abbildung 32) bleibt zu beachten, dass diese das Verhalten idealisierter Systeme widerspiegeln. In der Anwendung wird sich z.B. nicht immer eine strikte Trennung in Probe und Wärmebad treffen lassen. Auch können inhomogene Eigenschaften einer realen Probe zu abweichendem Verhalten bei praktischen Messungen führen. Dennoch sind die Ergebnisse richtungsweisend und helfen beim Verständnis der Geschwindigkeitsgrenzen von Raman-Mikrospektroskopie.

Die gewonnenen Erkenntnisse können über Raman-Anwendungen hinaus auf andere Arten der Mikroskopie und Mikrospektroskopie, bei denen die Arbeitsgeschwindigkeit durch die Zerstörschwelle der Probe limitiert ist, übertragen werden. Auch wenn der deutlich höhere Wirkungsquerschnitt der Fluoreszenz geringere Bestrahlungsstärken für gleiche Bildraten zulässt, so werden an die Fluoreszenzmikroskopie im gleichen Maße gesteigerte Anforderungen gestellt. Volumenbildgebung in Videorate kann gerade bei lebenden Organismen auch in der Fluoreszenzmikroskopie an thermische Grenzen stoßen. Ist die thermische Grenze nicht die dominierende, wie beim Bleichen von Fluorophoren, so kann Wärmeleitung vernachlässigt werden. Dann kommt es darauf an, die maximale Beleuchtungsintensität oder die gesamte Beleuchtungsenergie in der Probe so gering wie möglich zu halten. Hier haben sich Lichtschichttechniken empirisch bewährt [22].

4. Zusammenfassung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Geschwindigkeit der Raman-Mikrospektroskopie so zu erhöhen, dass deren Vorzüge für neue Aufgabenstellungen im Bereich der Lebenswissenschaften nutzbar werden.

Es wurde ein Raman-Mikrospektrometer entwickelt, welches eine Lichtschichtbeleuchtung zur Anregung der Probe mit einem ebenfalls neu entwickelten Fourier-Transformations-Spektrometer kombiniert. Dieses Fourier-Transformations-Spektrometer zeichnet sich dadurch aus, dass es hohe spektrale Auflösung, großes Bildfeld und hohe Stabilität miteinander vereint.

Das neue Raman-Mikrospektrometer war in der Lage, von einer Polymerprobe über 4 000 000 Spektren mit einer spektralen Auflösung von $4,4 \text{ cm}^{-1}$ in unter 14 min aufzuzeichnen. Das zum Vergleich herangezogene konfokale Raman-Mikrospektrometer hätte für die gleiche Aufgabe 213-mal länger benötigt, jedoch in dieser Zeit auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht. Um die Anwendbarkeit auf biologische Proben zu testen, wurde ein Volumen einer Zebrafischprobe in 50 Bildebenen mit jeweils voller spektraler Information aufgezeichnet. Bei vergleichbarer Abbildungsqualität erwies sich das neu entwickelte Raman-Mikrospektrometer noch immer als 5,3-mal schneller als das konfokale.

Um die geschwindigkeitsbegrenzenden Faktoren besser zu verstehen, wurden die Signalentstehung in Mikrospektrometern verschiedenen Typs und der Einfluss der Beleuchtung auf die Probe theoretisch untersucht. Der theoretische Vergleich hat den Geschwindigkeitsgewinn der Lichtschichttechnik gegenüber konfokaler Mikrospektrometer bestätigt und hilft die Geschwindigkeitsgrenzen unter verschiedenen Bedingungen zu verstehen. Er lässt auch Aussagen über unerforschte und hypothetische Mikrospektrometer zu.

So konnten die Kombination einer Lichtschichtbeleuchtung mit einem integralen Feldspektrometer und die Kombination einer Linienbeleuchtung mit einem zeilenweise abtastenden, dispersiven Spektrometer als vielversprechende Ansätze für die Raman-Bildgebung im biomedizinischen Umfeld identifiziert werden.

Mit dieser Arbeit liegt erstmals ein belastbarer Wegweiser vor, welcher Möglichkeiten der Beschleunigung von Raman-Mikrospektroskopie für die empfindlichen Proben der Lebenswissenschaften aufzeigt. Die gewonnenen Erkenntnisse können darüber hinaus auf andere Arten der Mikroskopie und Mikrospektroskopie, bei denen die Arbeitsgeschwindigkeit durch eine thermische Zerstörschwelle der Probe limitiert ist, übertragen werden. Für andere Mechanismen der Zerstörung, die z.B. an die Bestrahlungsstärke gebunden sind, bietet die theoretische Analyse in dieser Arbeit einen guten Ausgangspunkt für weitere Betrachtungen.

5. Anhang

Anhangsverzeichnis

- A1. Die Wellenzahl
- A2. Technische Daten des Lasers: Genesis CX577-2000 SLM
- A3. Technische Daten der Kamera: ORCA-Flash4.0 V2 Digital CMOS
- A4. Gaußsche Strahlenoptik
- A5. Übersicht über verschiedene Beleuchtungsgeometrien
- A6. Berechnung des Signalfaktors für verschiedene Mikroskope
- A7. Einordnung verschiedener bildgebender Spektrometer
- A8. Vergleich der Abtastprozesse verschiedener Spektrometerklassen
- A9. Abtastprozess für fensterweise abtastende Spektrometer
- A10. Wärmeleitungskern für konstante Anregung
- A11. Radius des Wärmeleitungskerns für konstante Anregung
- A12. Temperaturverteilung im thermisch stationären Zustand

A1. Die Wellenzahl

Die Wellenzahl bezeichnet den Kehrwert der Wellenlänge:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}. \quad (\text{A1})$$

Für den hier verwendeten Laser ergeben sich folgende Werte:

$\tilde{\nu}$	Wellenzahl:	17337 cm^{-1} ,
λ	Wellenlänge:	$576,8 \text{ nm}$,
ν	Frequenz:	$519,75 \text{ THz}$,
c	Lichtgeschwindigkeit:	$299\,792\,458 \text{ m/s}$.

In der Lichtspektroskopie werden spektrale Verschiebungen häufig in relativen Wellenzahlen angegeben, wenn diese unabhängig von der Wellenlänge der Anregung sind. Die absolute Wellenlänge einer Spektrallinie λ_s lässt sich bei bekannter Anregung λ_0 leicht aus der Stokes-Verschiebung um eine bestimmte Wellenzahl $\Delta\tilde{\nu}$ berechnen:

$$\lambda_s = \frac{1}{\lambda_0^{-1} - \Delta\tilde{\nu}}. \quad (\text{A2})$$

Für die symmetrische Strettschwingung von Wasser ergeben sich folgende Werte:

λ_0	Wellenlänge der Anregung:	$576,8 \text{ nm}$,
$\Delta\tilde{\nu}$	Stokes-Verschiebung:	3400 cm^{-1} ,
λ_s	Wellenlänge der Spektrallinie:	$717,5 \text{ nm}$.

A2. Technische Daten des Lasers: Genesis CX577-2000 SLM

Für den Aufbau des Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers wurde ein optisch gepumpter Halbleiterlaser (optically pumped semiconductor Laser OPSEL) verwendet.

Hersteller:	Coherent	
Name:	Genesis CX577-2000 SLM Laser Diode System	
Leistung (max.):	2,0 W	
Wellenlänge**:	576,8 nm	
Linienbreite FWHM*:	<5 MHz	($< 0,000\ 166\ \text{cm}^{-1}$)
RMS-Rauschen ($10 - 10^8\ \text{Hz}$)**:	0,018%	
M^2 **:	h: 1,00	v: 1,02
Tailendurchmesser**:	h: 2,17 mm	v: 2,02 mm
Divergenz**:	h: 0,34 mrad	v: 0,37 mrad
Asymmetrie**:	0,93	
Polarisationsverhältnis**:	1770:1	
Polarisation**	4,5° vertikal linear	

*Angaben: Spezifikation aus dem allgemeinen Herstellerdatenblatt

**Angaben: Messwerte aus dem Anwenderdatenblatt des Modells

A3. Technische Daten der Kamera: ORCA-Flash4.0 V2 Digital CMOS

Für den Aufbau des Lichtschicht-Raman-Mikrospektrometers wurde eine sCMOS-Kamera verwendet.

Hersteller:	Hamamatsu
Name:	ORCA-Flash4.0 V2 Digital CMOS camera
Pixel*:	2048 × 2048
Pixelgröße*:	6,5 μm × 6,5 μm
Effektive Detektorfläche*:	13,312 mm × 13,312 mm
Quanteneffizienz*:	> 70% bei 600 nm; > 60% bei 700 nm
Ausleserauschen (RMS)*:	1,5 Elektronen bei 30 f/s
Dunkelstrom (Luftkühlung)*:	0,5 Elektronen/Pixel/s
Pixelkapazität*:	30 000 Elektronen
AD-Wandler*:	16 Bit
Kalibration**:	0,46 Elektronen/AD-Wandlerstufe
Bildrate bei voller Pixelzahl*:	30 f/s und 100 f/s

*Angaben: Spezifikation aus dem allgemeinen Herstellerdatenblatt

**Angaben: Labormessung, Auswertung mit dipimage [46] Funktion cal_readnoise [94]

A4. Gaußsche Strahlenoptik

A4.1. Die paraxiale Helmholtz-Gleichung in x-Richtung

Die homogene Wellengleichung für die komplexe Wellenfunktion $U(\vec{r}, t)$ lautet in 3D:

$$\nabla^2 U(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 U(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = 0. \quad (\text{A3})$$

Mit dem Separationsansatz:

$$U(\vec{r}, t) = U(\vec{r}) e^{2\pi i \nu t}, \quad (\text{A4})$$

ergibt sich die Helmholtz-Gleichung für die komplexe Amplitude $U(\vec{r})$:

$$\nabla^2 U(\vec{r}) + k^2 U(\vec{r}) = 0 \quad \text{mit} \quad k = \frac{2\pi \nu}{c} = \frac{\omega}{c}. \quad (\text{A5})$$

Es lässt sich eine Welle $U(\vec{r})$ aus einer ebenen Trägerwelle (in die hier ausgezeichnete x-Richtung) und einer vom Ort abhängigen Einhüllenden $A(\vec{r})$ konstruieren:

$$U(\vec{r}) = A(\vec{r}) e^{-ikx}. \quad (\text{A6})$$

Setzt man diesen Ansatz in die Helmholtz-Gleichung ein, ergibt sich in Schritten:

$$\nabla^2 (A(\vec{r}) e^{-ikx}) + k^2 A(\vec{r}) e^{-ikx} = 0, \quad (\text{A7})$$

$$A(\vec{r}) \frac{\partial^2}{\partial x^2} e^{-ikx} + 2 \langle \nabla A(\vec{r}) | \nabla e^{-ikx} \rangle + e^{-ikx} \cdot \nabla^2 A(\vec{r}) + k^2 A(\vec{r}) e^{-ikx} = 0, \quad (\text{A8})$$

$$\frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial z^2} - 2ik \frac{\partial A(\vec{r})}{\partial x} = 0. \quad (\text{A9})$$

Die paraxiale Näherung der Helmholtz-Gleichung geht davon aus, dass sich das Profil des Strahls entlang der Ausbreitungsrichtung x nur langsam ändert. Damit kann die zweite Ableitung nach x gegen die erste vernachlässigt werden:

$$k \frac{\partial A(\vec{r})}{\partial x} \gg \frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial x^2}. \quad (\text{A10})$$

Nach dieser Näherung erhält man die homogene, paraxiale Helmholtz-Gleichung in x-Richtung:

$$\frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial z^2} - 2ik \frac{\partial A(\vec{r})}{\partial x} = 0. \quad (\text{A11})$$

A4.2. Der elliptische Gauß-Strahl

Gauß-Strahlen sind Eigenfunktionen der homogenen, paraxialen Helmholtz-Gleichung [95]. Diese lautet o.B.d.A. mit x als Ausbreitungsrichtung (siehe A4.1.):

$$\frac{\partial^2 A}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 A}{\partial z^2} - 2ik \frac{\partial A}{\partial x} = 0 \quad \text{mit} \quad U(x, y, z) = A(x, y, z)e^{-ikx}. \quad (\text{A12})$$

Die paraxiale Welle $U(x, y, z)$ wird aus einer ebenen Trägerwelle mit der Kreiswellenzahl k und einer langsam vom Ort abhängigen Einhüllenden $A(x, y, z)$ konstruiert. Eine Lösung der homogenen, paraxialen Helmholtz-Gleichung ist der elliptische Gauß-Strahl [33] (siehe Abbildung 33):

$$U(x, y, z) = U_0 \sqrt{\frac{w_{0y}}{w_y(x)}} \sqrt{\frac{w_{0z}}{w_z(x)}} \cdot e^{-\left(\frac{y}{w_y(x)}\right)^2} \cdot e^{-\left(\frac{z}{w_z(x)}\right)^2} \cdot e^{-i \cdot \varphi(x, y, z)}. \quad (\text{A13})$$

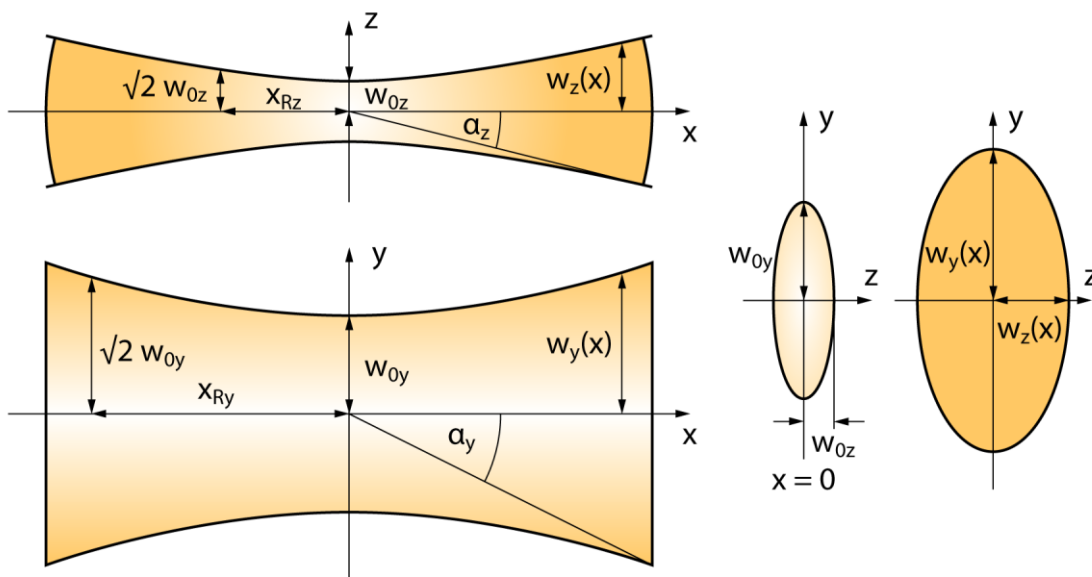


Abbildung 33: Schematische Intensitätsprofile des elliptischen Gauß-Strahls in x -Richtung. (links) Draufsicht und Seitenansicht, (rechts) Querschnitte für $x = 0$ und eine beliebige Position. Die Koordinaten und Visualisierungsparameter sind entsprechend einer Lichtschichtbeleuchtung mit der Ausbreitungsrichtung x und der Blickrichtung z gewählt.

Als Strahlradien $w_y(x)$ und $w_z(x)$ werden diejenigen Abstände entlang y - bzw. z - zur x - Achse definiert, bei denen die Amplitude auf $1/e$ (ca. 36%), die Intensität also auf $1/e^2$ (ca. 13,5%), gefallen ist:

$$w_y(x) = w_{0y} \sqrt{1 + \left(\frac{x}{x_{Ry}}\right)^2}, \quad w_z(x) = w_{0z} \sqrt{1 + \left(\frac{x}{x_{Rz}}\right)^2}. \quad (\text{A14})$$

Dabei sind die beiden Rayleighlängen (mit dem Brechungsindex n und der Wellenlänge λ) gegeben durch:

$$x_{Ry} = \frac{n\pi w_{0y}^2}{\lambda}, \quad x_{Rz} = \frac{n\pi w_{0z}^2}{\lambda}. \quad (\text{A15})$$

Die beiden Tailen Radien w_{0y} und w_{0z} lassen sich durch die numerischen Aperturen NA_y und NA_z des Gauß-Strahls ausdrücken (siehe Anhang A4.3.):

$$w_{0y} = \lambda \frac{\sqrt{n^2 - NA_y^2}}{n\pi \cdot NA_y}, \quad w_{0z} = \lambda \frac{\sqrt{n^2 - NA_z^2}}{n\pi \cdot NA_z}. \quad (\text{A16})$$

Die numerischen Aperturen NA_y und NA_z sind dabei für die y - und die z -Richtung über die halben Divergenzwinkel α_y und α_z des Gauß-Strahls im Fernfeld definiert:

$$NA_y = n \cdot \sin \alpha_y, \quad NA_z = n \cdot \sin \alpha_z. \quad (\text{A17})$$

Tatsächlich verbietet die paraxiale Näherung der Gauß-Optik die Verwendung großer Winkel α . Für viele Abschätzungen sind die Ergebnisse trotzdem ausreichend genau [80].

Die Intensität des elliptischen Gauß-Strahls ergibt sich zu:

$$I(x, y, z) = |U(x, y, z)|^2 = I_0 \frac{w_{0y}}{w_y(x)} \frac{w_{0z}}{w_z(x)} \cdot e^{-2\left(\frac{y}{w_y(x)}\right)^2} \cdot e^{-2\left(\frac{z}{w_z(x)}\right)^2}. \quad (\text{A18})$$

Die Gesamtleistung des Gauß-Strahls beträgt:

$$P = \frac{I_0 \pi}{2} w_{0y} \cdot w_{0z}. \quad (\text{A19})$$

Die Leistung P_i innerhalb der Ellipse mit den x abhängigen Halbachsen $w_y(x)$ und $w_z(x)$ beträgt unabhängig von der Position x entlang der optischen Achse 86,5% der Gesamtleistung P :

$$P_i = P(1 - e^{-2}) \approx 0,865P. \quad (\text{A20})$$

A4.3. Taillenradius w_0 und numerische Apertur NA eines Gauß-Strahls

Es wird aus der Strahlenoptik der Zusammenhang zwischen Taillenradius w_0 und numerischer Apertur NA eines isotropen Gauß-Strahls hergeleitet.

Für den isotropen Gauß-Strahl mit der Ausbreitung in x -Richtung beträgt der Strahlradius:

$$w(x) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{x}{x_R}\right)^2}, \quad (\text{A21})$$

und die Rayleighlänge:

$$x_R = \frac{n\pi w_0^2}{\lambda}. \quad (\text{A22})$$

Der halbe Öffnungswinkel α eines Gauß-Strahles beträgt somit:

$$\alpha = \lim_{x \rightarrow \infty} \tan^{-1} \left(\frac{w(x)}{x} \right) = \tan^{-1} \left(\frac{\lambda}{n\pi w_0} \right). \quad (\text{A23})$$

Die numerische Apertur NA ergibt sich aus:

$$NA = n \sin \alpha = n \frac{\frac{\lambda}{n\pi w_0}}{\sqrt{1 + \left(\frac{\lambda}{n\pi w_0}\right)^2}}. \quad (\text{A24})$$

Der Taillenradius w_0 beträgt somit:

$$w_0 = \frac{\lambda}{n\pi \tan \sin^{-1} \left(\frac{NA}{n} \right)} = \frac{\lambda}{\pi NA} \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n}\right)^2} = \lambda \frac{\sqrt{n^2 - NA^2}}{n\pi \cdot NA}. \quad (\text{A25})$$

Für einen elliptischen Strahl betragen die beiden Taillendurchmesser:

$$w_{0y} = \lambda \frac{\sqrt{n^2 - NA_y^2}}{n\pi \cdot NA_y}, \quad w_{0z} = \lambda \frac{\sqrt{n^2 - NA_z^2}}{n\pi \cdot NA_z}. \quad (\text{A26})$$

A5. Übersicht über verschiedene Beleuchtungsgeometrien

Tabelle 13: Übersicht über verschiedene Beleuchtungsgeometrien

Name	NA_x	NA_y	NA_z	Feld x	Feld y	Feld z	Geometrie
Konfokal (xy-isotrop)	h	h	A	s	s	A	
Linienkonfokal	n - h	h	A	w	s	A	
Lichtschicht	A	n - h	n	A	w	s	
kollimiertes Strahlenbündel (Lichtlinie)	A	n	n	A	s	s	
Weitfeld	n - h	n - h	A	w	w	A	

Ausbreitungsrichtung: **A**

Numerischen Apertur NA : n: niedrig; h: hoch

Feld: s: schmal; w: weit

Die optische Achse der Detektionsoptik verläuft in z-Richtung.

A6. Berechnung des Signalfaktors für verschiedene Mikroskope

Der Signalfaktor lässt sich für alle Mikroskopgeometrien berechnen mit (Kapitel 3.1.6.):

$$J_f = \iiint \hat{I}_P(x_0, y_0, z_0) \cdot PSF_D(x_0, y_0, z_0) dx_0 dy_0 dz_0 . \quad (78)$$

Die Punktspiezfunktion der Detektionsoptik PSF_D mit gaußförmiger Pupille und optischer Achse in z-Richtung ist dabei stets gegeben durch:

$$PSF_D(x, y, z) = \frac{2}{\pi} \frac{1}{w_D^2(z)} \cdot e^{-2 \frac{x^2 + y^2}{w_D^2(z)}} . \quad (77)$$

Durch geeignete Wahl der Beleuchtung \hat{I}_P lassen sich die Signalfaktoren analytisch angeben.

A6.1. Das (xy-isotrope) konfokale Mikroskop

Für ein ideales, konfokales Mikroskop sind die Punktspiezfunktion der Beleuchtungsoptik PSF_I und die der Detektionsoptik PSF_D rotationssymmetrisch entlang der optischen Achse (z-Richtung) und spiegelsymmetrisch bezüglich der xy-Ebene. Die Parameter des Gauß-Strahls sind somit gegeben durch: $w_{0x} = w_{0y} = w_0$. Zusammen mit einer punktförmigen Lichtquelle ergibt sich die normierte Intensitätsverteilung der Beleuchtung in der Probe mit der Ausbreitungsrichtung z zu:

$$\hat{I}_P(x, y, z) = \frac{w_{P0}^2}{w_P^2(z)} \cdot e^{-2 \frac{x^2 + y^2}{w_P^2(z)}} . \quad (A27)$$

Im Falle gleicher oder identischer Optiken für Beleuchtung und Detektion gilt unter Vernachlässigung der Stokes-Verschiebung: $w_P(z) = w_D(z) = w(z)$. Der Signalfaktor aus Gleichung (78) ergibt sich aus der Punktspiezfunktion der Detektionsoptik PSF_D mit z als optischer Achse aus Gleichung (77) und der Intensitätsverteilung ebenfalls mit z als Ausbreitungsrichtung aus Gleichung (A27) zu:

$$J_f = \frac{2}{\pi} \iiint \frac{w_0^2}{w^4(z)} \cdot e^{-4 \frac{x^2 + y^2}{w^2(z)}} dx dy dz , \quad (A28)$$

$$J_f = w_0^2 \frac{n\pi^2}{2\lambda} . \quad (A29)$$

Wird der Öffnungswinkel des Gauß-Strahls durch die numerische Apertur NA ausgedrückt:

$$w_0^2 = \lambda^2 \frac{n^2 - NA^2}{n^2 \pi^2 \cdot NA^2} , \quad \text{ergibt sich:} \quad (A30)$$

$$J_f = \frac{\lambda}{2} \cdot \frac{n^2 - NA^2}{n \cdot NA^2} . \quad (A31)$$

Im Vergleich dazu kann die axiale Auflösung eines konfokalen Mikroskops abgeschätzt werden mit [80]:

$$d_z = \frac{n\lambda}{2 \cdot NA^2}. \quad (\text{A32})$$

A6.2. Das linienkonfokale Mikroskop

Im Unterschied zum xy-isotropen konfokalen Mikroskop ist die Beleuchtung eines linienkonfokalen Mikroskops in einer Richtung (o.B.d.A. der x-Richtung) ausgedehnt. Praktisch kann diese Ausdehnung auf verschiedene Weise realisiert werden: durch Aufweiten der Strahlung einer räumlich kohärenten Lichtquelle in einer Richtung, durch Abbilden einer inkohärenten linienförmigen Lichtquelle oder durch schnelles Scannen mit einer punktförmigen Lichtquelle. Für die hier angenommene durchsichtige und inkohärent emittierende Probe können diese Beleuchtungen als äquivalent betrachtet werden. Es liegt also nahe, die Beleuchtung mit einem in y-Richtung gaußförmigen und in x-Richtung kollimierten ($w_{0x} \rightarrow \infty$) Strahlenbündel zu beschreiben:

$$\hat{I}_p(x, y, z) = \frac{w_{p0y}}{w_{py}(z)} \cdot e^{-2\left(\frac{y}{w_{py}(z)}\right)^2}. \quad (\text{A33})$$

Für gleiche Öffnungswinkel von Beleuchtungs- und Detektionsoptik gilt unter Vernachlässigung der Stokes-Verschiebung:

$$w_{py}(z) = w_D(z) = w(z). \quad (\text{A34})$$

Der Signalfaktor ergibt sich zu:

$$J_f = \iiint \frac{w_0}{w(z)} \cdot e^{-2\frac{y^2}{w^2(z)}} \cdot \frac{2}{\pi} \frac{1}{w^2(z)} \cdot e^{-2\frac{x^2+y^2}{w^2(z)}} dx dy dz. \quad (\text{A35})$$

Da dieser Ausdruck divergent ist, führt er nur für Proben endlicher Höhe Δz zu einem endlichen Ergebnis:

$$J_f = \frac{2}{\pi} \int_{-\frac{\Delta z}{2}}^{\frac{\Delta z}{2}} \iint \frac{w_0}{w^3(z)} \cdot e^{-2\frac{x^2+y^2}{w^2(z)}} dx dy dz, \quad (\text{A36})$$

$$J_f = \frac{\sqrt{2}n\pi}{\lambda} w_0^2 \cdot \log \left[\frac{\Delta z \cdot \lambda + \sqrt{\Delta z^2 \lambda^2 + 4n^2 \pi^2 w_0^4}}{2n\pi w_0^2} \right]. \quad (\text{A37})$$

Durch die Wahl von Δz lässt sich zwischen in der gesamten Probe gestreutem Licht, und solchem, welches nur in einer dünnen Schicht um den Fokus gestreut wird, unterscheiden.

A6.3. Das Lichtschichtmikroskop

Die Beleuchtung eines Lichtschichtmikroskops ist so geformt, dass möglichst nur der von der Detektionsoptik scharf abgebildete Bereich ausgeleuchtet ist. Die Herausforderung besteht darin, eine möglichst dünne und gleichzeitig kollimierte Ausleuchtung zu formen. Praktisch kommen elliptische Gauß-Strahlen (Kapitel 2) oder Gitter-Lichtschicht-Beleuchtungen [71] zum Einsatz. Um Kompromisse bezüglich Schichthöhe und -homogenität aus der Diskussion auszuschließen, soll hier eine homogene xy-Gauß-Fläche mit der Höhe w_{P0z} angenommen werden. Es bleibt lediglich zu beachten, dass die Lösung bei großer Divergenz nur für einen kleinen Probenausschnitt gültig ist (w_{P0z} wird zu einem Parameter). Die Intensitätsverteilung einer solchen Schicht mit Ausbreitung in der xy-Ebene ist gegeben durch:

$$\hat{I}_p(x, y, z) = e^{-2\left(\frac{z}{w_{P0z}}\right)^2} . \quad (\text{A38})$$

Der Signalfaktor ergibt sich zu:

$$J_f = \int e^{-2\left(\frac{z}{w_{P0z}}\right)^2} \iint PSF_D(x, y, z) dx dy dz . \quad (\text{A39})$$

Benutzt man die Normierung der PSF (59) aus Kapitel 3.1.2., lässt sich unabhängig von der Form der Punktspreadfunktion der Detektionsoptik PSF_D schreiben:

$$J_f = \int e^{-2\left(\frac{z}{w_{P0z}}\right)^2} dz , \quad (\text{A40})$$

$$J_f = \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_{P0z} . \quad (\text{A41})$$

Für das Lichtschichtmikroskop ist der Faktor J_f gleichzeitig ein Maß für die axiale Auflösung.

A6.4. Mikroskop mit einer Linienbeleuchtung

Die Verbindung eines zeilenweise abtastenden Mikroskops mit einer zur Detektionsrichtung orthogonalen Beleuchtung ergibt eine Beleuchtungslinie. Praktisch lässt sich solch ein kollimiertes Strahlenbündel aus einem schwach fokussierten, runden Gauß-Strahl erzeugen. Unter Vernachlässigung der ortsabhängigen Divergenz $w_{py}(x) = w_{pz}(x) = w_{p0}$ lässt sich die Intensitätsverteilung einer solchen Lichtlinie o.B.d.A. in x-Richtung beschreiben durch:

$$\hat{I}_p(x, y, z) = e^{-2\frac{y^2+z^2}{w_{p0}^2}} . \quad (\text{A42})$$

Der Signalfaktor ergibt sich zu:

$$J_f = \iiint e^{-2\frac{y^2+z^2}{w_{p0}^2}} \cdot \frac{2}{\pi} \frac{1}{w_D^2(z)} \cdot e^{-2\frac{x^2+y^2}{w_D^2(z)}} dx dy dz , \quad (\text{A43})$$

$$J_f = \frac{n\pi \cdot w_{p0} \cdot w_{D0}}{\lambda} \cdot e^{-\frac{n^2\pi^2 \cdot w_{D0}^2 \cdot (w_{p0}^2 + w_{D0}^2)}{w_{p0}^2 \cdot \lambda^2}} \cdot K_0\left(\frac{n^2\pi^2 \cdot w_{D0}^2 \cdot (w_{p0}^2 + w_{D0}^2)}{w_{p0}^2 \cdot \lambda^2}\right) . \quad (\text{A44})$$

Dabei ist $K_n(z)$ die modifizierte Bessel-Funktion zweiter Gattung. Sie erfüllt die Differentialgleichung:

$$z^2 y'' + zy' - (z^2 + n^2)y = 0 . \quad (\text{A45})$$

In verschiedenen Computeralgebrasystemen ist diese Funktion implementiert. In Mathematica heißt sie: „BesselK(n,z)“ und in Matlab: „besselk(nu,z)“.

Es bleibt wieder zu beachten, dass die Lösung bei großer Divergenz w_{p0} nur für einen kleinen Probenausschnitt gültig ist (w_{p0} wird zu einem Parameter).

A6.5. Das Weitfeldmikroskop

Das Weitfeldmikroskop ist durch eine homogene Beleuchtung der gesamten Probe charakterisiert. Die normierte Intensitätsverteilung ist somit gegeben durch:

$$\widehat{I}_P(x, y, z) = 1 . \quad (\text{A46})$$

Der Signalfaktor ergibt sich zu:

$$J_f = \iiint PSF_D(x, y, z) dx dy dz . \quad (\text{A47})$$

Benutzt man die Normierung der PSF (59) aus Kapitel 3.1.2., lässt sich unabhängig von der Form der Punktspreadfunktion der Detektionsoptik PSF_D schreiben:

$$J_f = \int_{z'}^{z'+\Delta z} \iint PSF_D(x, y, z) dx dy dz = \Delta z . \quad (\text{A48})$$

Das Signal steigt demnach proportional mit der Probenhöhe Δz an, was zu erwarten ist, da ein Weitfeldmikroskop keine von null verschiedenen Ortsfrequenzen in z-Richtung überträgt, also nicht über die Fähigkeit verfügt, optische Schnitte zu erzeugen. Demnach wird der größte Signalanteil einer dicken Probe außerhalb des Fokus generiert und trägt somit nicht zu einem scharfen Bild, jedoch zum Gesamttrauschen bei. Um dies zu berücksichtigen, werden hier zwei verschiedene Signalfaktoren eingeführt. Der Faktor J_f repräsentiert das Licht, das im Fokus generiert wird. Als Maß wird die Schärfentiefe des Weitfeldmikroskops mit der numerischen Apertur NA_D verwendet [96]:

$$J_f = 2 \frac{\lambda n}{NA_D^2} . \quad (\text{A49})$$

Der Faktor J_{fg} , der ein q_M -Faches von J_f ist, repräsentiert das gesamte in der Probe der Höhe Δz generierte Licht:

$$J_{fg} = J_f \cdot q_M = \Delta z . \quad (\text{A50})$$

Der Faktor q_M gibt somit das Verhältnis aus dem gesamt gesammelten Licht und dem Licht aus dem Fokus der Probe an. Für eine dünne Probe ist:

$$q_M = 1 . \quad (\text{A51})$$

A7. Einordnung verschiedener bildgebender Spektrometer

Verschiedene bildgebende Spektrometer lassen sich nach den beiden Merkmalen: Methode der spektralen Codierung und Methode der örtlichen Codierung einordnen. Einige Spektrometerklassen finden bereits Anwendung in der Mikrospektroskopie (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Bildgebende Spektrometer nach Methoden spektraler und örtlicher Codierung geordnet⁸

Spektral Örtlich	Filterbasiert	Dispersiv	Interferometrisch
Punktweise	-	Gitter-, Prismenspektrometer [4]	-
Linienweise	-	Gitter-, Prismenspektrometer [14]–[16]	Statische FT-Spektrometer: <i>Sagnac</i>
Rahmenweise	Bandsequenzielle Filterräder, Lyot-Filter [97]	Panchromatisch / integrale Feldspektrometer [98]: <i>Linsenarraybasiert</i> [75]–[77] <i>Faserbasiert</i> [99] <i>Bildzerschneidend</i> [100] <i>Tomographisch (CTIS)</i> [101] ⁹	Abstimmbare FT-Spektrometer: <i>Michelson</i> -[102], <i>Mach-Zehnder-Interferometer</i> (Kapitel 2)
Fensterweise	Filterfelder, Gradientenfilter, Abstimmbare Bragg-Filter [103], [104]	-	Statische FT-Spektrometer: <i>Mach-Zehnder</i> -, <i>Sagnac-Interferometer</i> [37]

A8. Vergleich der Abtastprozesse verschiedener Spektrometerklassen


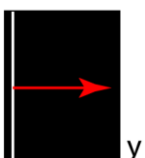
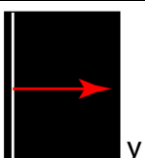
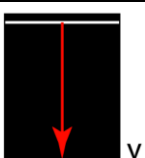
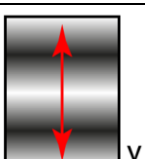
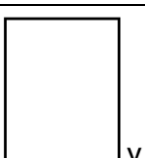
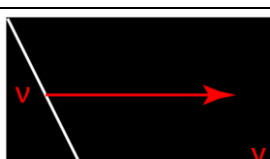
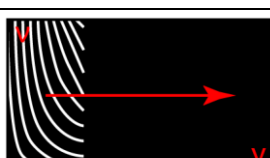
Charakteristisch für den Abtastprozess eines bildgebenden Spektrometers und somit klassenbestimmend ist die Durchlässigkeitsfunktion $D(x, y, \nu, t)$. Diese ist grafisch in Tabelle 15 für alle diskutierten Spektrometerklassen dargestellt. Die Durchlässigkeitsfunktion ist die Vorschrift, die angibt, wie die spektrale Strahldichte $L(x, y, \theta, \varphi, \nu)$ der Probe auf dem Detektor abgebildet wird. Als dritte Spalte der Tabelle ist die Anzahl der benötigten Detektorpixel für eine bestimmte Spektrometerklasse gegeben. Die Auswertung der Durchlässigkeitsfunktion ergibt zwei charakteristische Zeitspannen. Die spektrale Akkumulationszeit Δt bestimmt die Zeitspanne, innerhalb derer spektrale Strahldichte $L(x, y, \theta, \varphi, \nu)$ von einem Punkt (x, y, ν) auf dem Detektor akkumuliert wird. Sie ist nicht mit der Belichtungszeit τ für ein einzelnes Rohdatenbild des Detektors zu verwechseln. Die totale Messzeit T gibt die gesamte, für die Datenaufnahme eines hyperspektralen Bildes mit $n_x \cdot n_y$ örtlichen Abtastwerten (Pixel) und n_ν spektralen Abtastwerten nötige, Zeit an. Bei der fensterweisen Abtastung taucht in den Termen zusätzlich die Anzahl der Detektorpixel n_j in Abtastrichtung auf,

⁸ inspiriert durch [68] jedoch mit punktwiser Abtastung und Beispielen aus der Spektroskopie

⁹ SNR in dieser Arbeit nicht diskutiert

da diese nicht mit einer Dimension des hyperspektralen Bildes übereinstimmen muss (siehe dazu auch A9.).

Tabelle 15: Vergleich der Abtastprozesse verschiedener Klassen bildgebender Spektrometer¹⁰

Örtliche (Spektrale) Auflösung	Durchlässigkeitsfunktion $D(x, y, \nu, t)$ Abtastrichtung (rot)	Detektorpixel $n_i n_j =$	Spektrale Akkumulationszeit Δt	Belichtungszeit τ für ein Rohdatenbild	sonstige Effizienz η (Erläuterung)
Punktweise (Dispersiv)		n_ν	$\frac{T}{n_x n_y}$	$\frac{T}{n_x n_y}$	1 (ohne Absorption)
Linienweise (Dispersiv)		$n_x n_\nu$	$\frac{T}{n_y}$	$\frac{T}{n_y}$	1 (ohne Absorption)
Linienweise (Interferometrisch)		$n_x 2n_\nu$	$\frac{T}{n_y}$	$\frac{T}{n_y}$	1/2 (ein Ausgang)
Rahmenweise (Filterbasiert)		$n_y n_x$	$\frac{T}{n_\nu}$	$\frac{T}{n_\nu}$	1 (ohne Absorption)
Rahmenweise (Interferometrisch)		$n_y n_x$	T	$\frac{T}{2n_\nu}$	1/2 (ein Ausgang)
Rahmenweise (Panchromatisch/dispersiv)		$n_x n_y n_\nu$	T	T	1 (ideal)
Fensterweise (Filterbasiert)		$n_x n_j$	$\frac{T}{n_\nu n_y + n_j}$	$\frac{T}{n_\nu n_y + n_j}$	1 (ohne Absorption)
Fensterweise (Interferometrisch)		$n_x n_j$	$T \frac{n_j}{n_y + n_j}$	$\frac{T}{n_\nu n_y + n_j}$	1/2 (ein Ausgang)

¹⁰ inspiriert durch [68] jedoch mit punktwiser Abtastung; Angaben für 3D-Volumenproben und nicht für einen langen 2D-Schwad (Aufnahmestreifen); für fensterweise Abtastung ist n_j nicht notwendigerweise gleich n_ν

A9. Abtastprozess für fensterweise abtastende Spektrometer

A9.1. Fensterweise abtastende, filterbasierte Spektrometer

Ein fensterweise abtastendes, filterbasiertes Spektrometer enthält einen Filterkeil oder ein Filterarray, welches in Schritten über das Bild der Probe geschoben wird (siehe Abbildung 34). Das Filterarray besteht dabei aus n_v verschiedenen Einzelfiltern bzw. Bandpass-Farbfilttern. Der Detektor besitzt n_j Pixel in Abtastrichtung y . Das Bild der Probe besitzt in Abtastrichtung n_y Pixel und orthogonal dazu n_x Pixel.

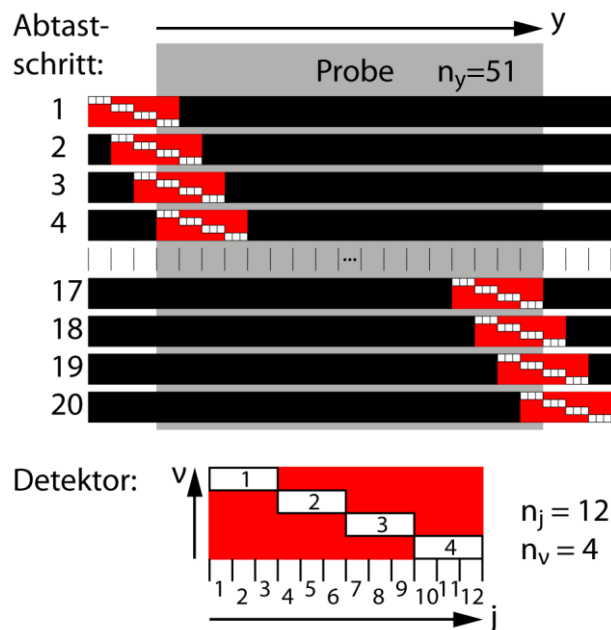


Abbildung 34: Abtastschema eines fensterweise abtastenden, filterbasierten Spektrometers

Die Anzahl n_k der Rohdatenbilder $R(i, j, n_t)$ die sequenziell aufgenommen werden, beträgt:

$$n_k = n_y \frac{n_v}{n_j} + (n_v - 1). \quad (\text{A52})$$

Der erste Summand bestimmt, in wie vielen Schritten der Filterkeil über das Bild der Probe geschoben werden muss, damit das erste Filter einmal alle Pixel der ROI abgetastet hat. Hier sind es die ersten 17 Schritte (vergleiche Abbildung 34). Der zweite Summand legt die Anzahl der Schritte fest, um die der Filterkeil weiter geschoben werden muss, damit von allen Pixeln der Probe ein volles Spektrum abgetastet wird (hier drei weitere). Es ist leicht zu erkennen, dass eine kleine Probe n_y bei einer gleichzeitig großen Anzahl von spektralen Abtastwerten n_v (typ. 1000 für Raman-Spektroskopie) zu einer großen Anzahl unvollendeter Spektren führt.

Bei einer großen Anzahl von spektralen Abtastwerten lässt sich -1 im letzten Term vernachlässigen und es ergibt sich die Anzahl der Rohdatenbilder zu:

$$n_k = n_v \frac{n_y + n_j}{n_j}. \quad (\text{A53})$$

Die Belichtungszeit τ für ein einzelnes Rohdatenbild ergibt sich als Quotient der totalen Messzeit T und der Anzahl der Rohdatenbilder n_k :

$$\tau = \frac{T}{n_k} = \frac{T}{n_v} \frac{n_j}{n_y + n_j}. \quad (\text{A54})$$

Die spektrale Akkumulationszeit Δt gibt an, wie lange spektrale Strahldichte $L(x, y, \theta, \varphi, \nu)$ von einem Punkt (x, y, ν) der spektralen Fluenz $H(x, y, \nu)$ akkumuliert wird. Sie ist hier offensichtlich identisch mit der Belichtungszeit τ :

$$\Delta t = \tau = \frac{T}{n_v} \frac{n_j}{n_y + n_j}. \quad (\text{A55})$$

Für hohe Anzahlen an spektralen Abtastwerten n_v kann es sinnvoll sein, das Spektrometer so zu konstruieren, dass die Anzahl der Detektorpixel in Abtastrichtung n_j mit der Anzahl n_v übereinstimmt.

A9.2. Fensterweise abtastende, interferometrische Spektrometer

Für fensterweise abtastende, interferometrische Spektrometer ändert sich der Abtastprozess prinzipiell nicht. Die Durchlässigkeitsfunktion eines Interferometers mit zwei Ausgängen lässt jedoch im Unterschied zur filterbasierten Klasse das gesamte Licht bei der Encodierung passieren. Demnach wird die spektrale Akkumulationszeit Δt im Vergleich dazu mit n_v multipliziert:

$$\Delta t = T \frac{n_j}{n_y + n_j}. \quad (\text{A56})$$

Ein Spektrometer mit nur einem Interferometerausgang kann mit dem Effizienzfaktor $\eta = 0,5$ berücksichtigt werden.

A10. Wärmeleitungskern für konstante Anregung

Berechnet werden soll der Wärmeleitungskern für eine zeitlich konstante Anregung über den Zeitraum T für verschiedene Dimensionen. Dabei ist a die Temperaturleitfähigkeit und n gibt die Anzahl an Raumdimensionen des Kerns an (vergleiche Gleichung (119)):

$$H_{n,T}(\vec{r}) = \int_0^T H_n(\vec{r}, t) dt = \int_0^T \frac{1}{\sqrt{4\pi a t}^n} e^{-\frac{\|\vec{r}\|^2}{4at}} dt. \quad (\text{A57})$$

Für eine Raumdimension gilt ($n = 1$):

$$H_{1,T}(x) = \sqrt{\frac{T}{\pi a}} \cdot e^{-\frac{\|x\|^2}{4aT}} - \frac{\|x\|}{2a} \cdot \text{Erfc}\left(\frac{\|x\|}{2\sqrt{aT}}\right), \quad (\text{A58})$$

mit der komplementären Fehlerfunktion $\text{Erfc}(z)$:

$$\text{Erfc}(z) := 1 - \text{Erf}(z) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt. \quad (\text{A59})$$

In Matlab ist diese Funktion implementiert als: „erfc(Z)“.

Für zwei Raumdimensionen gilt ($n = 2$):

$$H_{2,T}(\vec{r}) = \frac{E_1\left(\frac{\|\vec{r}\|^2}{4aT}\right)}{4\pi a}, \quad (\text{A60})$$

mit der Definition für das exponentielle Integral $E_1(z)$:

$$E_1(z) := \int_z^\infty \frac{e^{-t}}{t} dt. \quad (\text{A61})$$

In Matlab ist diese Funktion benannt als: „expint(Z)“.

Für drei Raumdimensionen gilt ($n = 3$):

$$H_{3,T}(\vec{r}) = \frac{1 - \text{Erf}\left(\frac{\|\vec{r}\|}{2\sqrt{aT}}\right)}{4\pi a \|\vec{r}\|}, \quad (\text{A62})$$

mit der Gaußschen Fehlerfunktion $\text{Erf}(z)$:

$$\text{Erf}(z) := \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt. \quad (\text{A63})$$

In Matlab ist diese Funktion benannt als: „erf(Z)“.

A11. Radius des Wärmeleitungskerns für konstante Anregung

Der Anteil $\hat{H}_{n,T}(R)/T$ von Wärme, der nach der Zeit T innerhalb einer Kugel mit dem Radius R um eine punktförmige Quelle verblieben ist, ergibt sich aus Gleichung (127):

$$\hat{H}_{n,T}(R) = \int_{\|\vec{r}\| < R} H_{n,T}(\vec{r}) d\vec{r}. \quad (127)$$

Für eine Raumdimension ($n = 1$) ist $\hat{H}_{1,T}(R)$ gegeben durch:

$$\hat{H}_{1,T}(R) = \int_{-R}^R H_{1,\tau}(x) dx = -\frac{R^2}{2a} + \frac{R\sqrt{\tau}}{\sqrt{a\pi}} \cdot e^{-\frac{R^2}{4a\tau}} + \left(\tau + \frac{R^2}{2a}\right) \cdot \text{Erf}\left(\frac{R}{2\sqrt{a\tau}}\right). \quad (A64)$$

Für eine Raumdimension ($n = 1$) ist $\hat{H}_{2,T}(R)$ gegeben durch (Integration in Polarkoordinaten):

$$\hat{H}_{2,T}(R) = \int_0^R H_{2,\tau}(r) 2\pi r dr = \tau - \tau e^{-\frac{R^2}{4a\tau}} + \frac{R^2}{4a} \cdot E_1\left(\frac{R^2}{4a\tau}\right). \quad (A65)$$

Für eine Raumdimension ($n = 1$) ist $\hat{H}_{3,T}(R)$ gegeben durch (Integration in Kugelkoordinaten):

$$\hat{H}_{3,T}(R) = \int_0^R H_{3,\tau}(r) 4\pi r^2 dr = \frac{R^2}{2a} - \frac{R\sqrt{\tau}}{\sqrt{a\pi}} \cdot e^{-\frac{R^2}{4a\tau}} + \left(\tau - \frac{R^2}{2a}\right) \cdot \text{Erf}\left(\frac{R}{2\sqrt{a\tau}}\right). \quad (A66)$$

A12. Temperaturverteilung im thermisch stationären Zustand

Aus der inhomogenen Wärmeleitungsgleichung wird im stationären Zustand die inhomogene Poisson-Gleichung:

$$-a\nabla^2 u(\vec{r}) = f(\vec{r}). \quad (133)$$

Diese lässt sich für bestimmte Spezialfälle auf wenige Dimensionen reduzieren und leicht analytisch lösen.

A12.1. Die unendliche Lichtschichtlösung der Poisson-Gleichung

Zur Beleuchtung wird die gleiche idealisierte Lichtschicht $I_P(x, y, z) = I_{P0} \cdot \hat{I}_P(x, y, z)$ wie in Anhang A6.3. angenommen. Sie breitet sich in x-Richtung aus, ist in y-Richtung unendlich ausgedehnt und hat in z-Richtung ein von x und y unabhängiges Gauß-Profil ($w_{Pz}(x) = w_{P0z}$). Somit verbleibt die eindimensionale, gewöhnliche Differentialgleichung orthogonal zur Lichtschicht zu lösen:

$$-\frac{d^2}{dz^2} u(z) = \frac{\mu_a}{k} I_{P0} e^{-2\left(\frac{z}{w_{P0z}}\right)^2}. \quad (\text{A67})$$

Das Ergebnis der zweifachen Integration nach z lässt sich mit Hilfe der in Anhang A10. gegebenen Fehlerfunktion $Erf(z)$ ausdrücken:

$$u(z) = -\frac{\mu_a}{2k} I_{P0} \left[\frac{w_{P0z}^2}{2} e^{-2\left(\frac{z}{w_{P0z}}\right)^2} + \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_{P0z} z \cdot Erf\left(\frac{\sqrt{2}z}{w_{P0z}}\right) \right] + c'z + c''. \quad (\text{A68})$$

Es beinhaltet zwei Konstanten, die so gewählt werden, dass die Randbedingungen erfüllt sind. Für eine symmetrische Probe, die in der Mitte beleuchtet wird, gilt $c' = 0$. Die Konstante c'' muss so gewählt werden, dass am Rand die Temperaturdifferenz Null ergibt:

$$u(\pm l) = 0. \quad (\text{A69})$$

Demnach ist:

$$c'' = \frac{\mu_a}{2k} I_{P0} \left[\frac{w_{P0z}^2}{2} e^{-2\left(\frac{l}{w_{P0z}}\right)^2} + \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_{P0z} l \cdot Erf\left(\frac{\sqrt{2}l}{w_{P0z}}\right) \right]. \quad (\text{A70})$$

Die maximale Temperaturdifferenz zum Wärmebad u_0 , welche in der Mitte der Beleuchtung zu finden ist, beträgt im stationären Zustand somit:

$$u(0) - u_0 = \frac{\mu_a}{2k} I_{P0} \left[\frac{w_{P0z}^2}{2} \left(e^{-2\left(\frac{l}{w_{P0z}}\right)^2} - 1 \right) + \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_{P0z} l \cdot Erf\left(\frac{\sqrt{2}l}{w_{P0z}}\right) \right]. \quad (\text{A71})$$

Das Ergebnis lässt sich für eine maximal erlaubte Temperaturerhöhung ($u_{crit} - u_0$) nach I_{P0} umstellen. Mit Gleichung (115) ergibt sich der Temperaturfaktor:

$$u_f(T \rightarrow \infty) = 2k \cdot \left[\frac{w_{P0z}^2}{2} \left(e^{-2\left(\frac{l}{w_{P0z}}\right)^2} - 1 \right) + \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_{P0z} l \cdot Erf\left(\frac{\sqrt{2}l}{w_{P0z}}\right) \right]^{-1}. \quad (\text{A72})$$

A12.2. Das kollimierte Strahlenbündel (Lichtlinie)

Zur Beleuchtung wird das gleiche idealisierte, zylinderförmige und kollimierte gaußsche Strahlenbündel $I_p(x, y, z)$ wie in Anhang A6.4. angenommen. Es breitet sich in x-Richtung aus und hat in y- und z-Richtung ein von x unabhängiges Gauß-Profil $w_{py}(x) = w_{pz}(x) = w_{p0}$. Unter Anwendung des Laplace-Operators in Zylinderkoordinaten:

$$\nabla^2 u(r, \varphi, x) = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial u}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 u}{\partial \varphi^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}, \quad (\text{A73})$$

mit:

$$r^2 = y^2 + z^2 \quad \text{und} \quad \tan \varphi = \frac{z}{y}, \quad (\text{A74})$$

ergibt sich folgende Form der inhomogenen Poisson-Gleichung:

$$-\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial u}{\partial r} \right) - \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 u}{\partial \varphi^2} - \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} = \frac{\mu_a}{k} I_{p0} \cdot e^{-2\left(\frac{r}{w_{p0}}\right)^2}. \quad (\text{A75})$$

Da die Ränder der Probe bisher als würfelförmig angenommen wurden, verschwindet allgemein nur der dritte Term des Laplaceoperators, nicht jedoch der zweite Term. Die statische Temperaturverteilung lässt sich jedoch leicht durch die Lösung für ein zylinderförmiges Gebiet mit dem Radius $R = l$ nach unten abschätzen. Die Lösung für ein zylinderförmiges Gebiet mit dem Radius $R = \sqrt{2}l$ gibt eine Abschätzung der Temperaturen nach oben. Demnach muss sich eine zylinderförmige Probe mit $l < R < \sqrt{2}l$ finden lassen, die im thermisch stationären Zustand dieselbe Mittentemperatur wie die würfelförmige Probe ausbildet. Eine sinnvolle Näherung bietet der Mittelwert der Radien eines Quadrates über den Winkel φ :

$$R = l \frac{4}{\pi} \int_0^{\frac{\pi}{4}} \frac{1}{\cos \varphi} d\varphi = l \frac{2 \log(3 + \sqrt{8})}{\pi} \approx 1,1222 \cdot l. \quad (\text{A76})$$

Somit lässt sich das würfelförmige Problem mit der Kantenlänge $2l$ in ein zylinderförmiges mit dem Radius R überführen. Dadurch verschwindet der zweite Term des Laplaceoperators ebenfalls und es ergibt sich nach zweifacher Integration mit dem exponentiellen Integral $E_1(z)$ (Anhang A10.):

$$u(r) = -\frac{\mu_a}{k} I_{p0} \left[c' \log(r) + \frac{1}{8} E_1 \left(\frac{2r^2}{w_{p0}^2} \right) w_{p0}^2 + c'' \right]. \quad (\text{A77})$$

Die erste Konstante c' ergibt sich aus Symmetriegründen, da die Temperaturverteilung in der Mitte ein lokales Extremum annimmt:

$$\frac{du}{dr}(0) = 0 \Rightarrow c' = \frac{w_{p0}^2}{4}. \quad (\text{A78})$$

Die zweite Konstante c'' muss den stetigen Übergang zum Wärmebad am Zylinderrand gewährleisten:

$$u(R) = 0 . \quad (\text{A79})$$

Die maximale Temperaturdifferenz zum Wärmebad u_0 , welche in der Mitte der Beleuchtung zu finden ist, beträgt im stationären Zustand mit der Eulerschen Konstante $\gamma \approx 0,577216$:

$$u(0) - u_0 = \frac{\mu_a}{8k} I_{P0} w_{P0}^2 \left[\gamma + \log\left(\frac{2}{w_{P0}^2}\right) + 2 \log(R) - E_1\left(\frac{2R^2}{w_{P0}^2}\right) \right] . \quad (\text{A80})$$

Das Ergebnis lässt sich für eine maximal erlaubte Temperaturerhöhung ($u_{crit} - u_0$) leicht nach I_{P0} umstellen. Mit Gleichung (115) ergibt sich der Temperaturfaktor:

$$u_f(T \rightarrow \infty) = \frac{8k}{w_{P0}^2} \cdot \left[\gamma + \log\left(\frac{2}{w_{P0}^2}\right) + 2 \log(R) - E_1\left(\frac{2R^2}{w_{P0}^2}\right) \right]^{-1} . \quad (\text{A81})$$

Die analytisch gefundenen thermisch stationären Zustände für die Lichtschicht und das kollierte Strahlenbündel stimmen mit denen der FEM (vergleiche Kapitel 3.4.4. und Abbildung 30) überein.

6. Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Chalmers and P. R. Griffiths, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Chichester: Wiley & Sons, 2002.
- [2] D. A. Long, "The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules. 2002," *West Sussex, Engl. John Wiley Sons Ltd*.
- [3] G. W. Faris and R. a Copeland, "Wavelength dependence of the Raman cross section for liquid water.," *Appl. Opt.*, vol. 36, no. 12, pp. 2686–2688, 1997.
- [4] T. Dieing, O. Hollricher, and J. Toporski, *Confocal raman microscopy*, vol. 158. Springer Science & Business Media, 2011.
- [5] C. Krafft and J. Popp, "The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis," *Anal Bioanal Chem*, vol. 407, no. 3, pp. 699–717, 2012.
- [6] C. Krafft, B. Dietzek, M. Schmitt, and J. Popp, "Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 4, p. 40801, 2012.
- [7] E. J. Blackie, E. C. Le Ru, and P. G. Etchegoin, "Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 40, pp. 14466–14472, 2009.
- [8] E. C. Le Ru, E. J. Blackie, M. Meyer, and P. G. Etchegoin, "Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 37, pp. 13794–13803, 2007.
- [9] K. Kneipp, *Surface - enhanced Raman scattering : physics and applications*. Berlin: Springer, 2006.
- [10] J. B. Pawley, *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. Springer US, 2006.
- [11] T. Meyer, O. Guntinas-Lichius, F. von Eggeling, G. Ernst, D. Akimov, M. Schmitt, B. Dietzek, and J. Popp, "Multimodal nonlinear microscopic investigations on head and neck squamous cell carcinoma: Toward intraoperative imaging," *Head Neck*, vol. 35, no. 9, pp. E280--E287, 2013.
- [12] T. W. Kee and M. T. Cicerone, "Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.," *Opt. Lett.*, vol. 29, no. 23, pp. 2701–2703, 2004.
- [13] M. Cicerone, "Molecular imaging with CARS micro-spectroscopy," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 33, pp. 179–185, 2016.
- [14] M. Bowden, D. J. Gardiner, G. Rice, and D. L. Gerrard, "Line-Scanned Micro Raman-Spectroscopy Using a Cooled Ccd Imaging Detector," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 21, no. 1, pp. 37–41, 1990.
- [15] C. J. De Grauw, C. Otto, and J. Greve, "Line-scan Raman microspectrometry for biological applications," *Appl. Spectrosc.*, vol. 51, no. 11, pp. 1607–1612, 1997.
- [16] J. Qi and W.-C. Shih, "Performance of line-scan Raman microscopy for high-

- throughput chemical imaging of cell population,” *Appl. Opt.*, vol. 53, no. 13, pp. 2881–2885, 2014.
- [17] P. A. Santi, “Light Sheet Fluorescence Microscopy A Review,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 59, no. 2, pp. 129–138, 2011.
- [18] H. Siedentopf and R. Zsigmondy, “Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser,” *Ann. Phys.*, vol. 315, no. 1, pp. 1–39, 1903.
- [19] A. H. Voie, D. H. Burns, and F. A. Spelman, “Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens,” *J. Microsc.*, vol. 170, no. 3, pp. 229–236, 1993.
- [20] J. Huisken and D. Y. R. Stainier, “Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology,” *Development*, vol. 136, no. 12, pp. 1963–1975, 2009.
- [21] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, “Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy,” *Science*, vol. 305, no. 5686, pp. 1007–1009, 2004.
- [22] “Method of the Year 2014,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 1–1, 2014.
- [23] Y. Oshima, H. Sato, H. Kajiura-Kobayashi, T. Kimura, K. Naruse, and S. Nonaka, “Light sheet-excited spontaneous Raman imaging of a living fish by optical sectioning in a wide field Raman microscope,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 15, pp. 16195–16204, 2012.
- [24] I. Barman, K. M. Tan, and G. P. Singh, “Optical sectioning using single-plane-illumination Raman imaging,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 41, no. 10, pp. 1099–1101, 2010.
- [25] W. Müller, M. Kielhorn, M. Schmitt, J. Popp, and R. Heintzmann, “Light sheet Raman micro-spectroscopy,” *Optica*, vol. 3, no. 4, pp. 452–457, 2016.
- [26] I. Rocha-Mendoza, J. Licea-rodriguez, M. Marro, O. E. Olarte, M. Plata-sanchez, and P. Loza-Alvarez, “Rapid spontaneous Raman light sheet microscopy using cw-lasers and tunable filters,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 9, pp. 3449–3461, 2015.
- [27] P. G. Pitrone, J. Schindelin, L. Stuyvenberg, S. Preibisch, M. Weber, K. W. Eliceiri, J. Huisken, and P. Tomancak, “OpenSPIM: an open-access light-sheet microscopy platform,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 7, pp. 598–599, 2013.
- [28] P. G. Pitrone, “Welcome to the OpenSPIM Wiki,” 2012. [Online]. Available: http://openspim.org/Welcome_to_the_OpenSPIM_Wiki. [Accessed: 12-Sep-2016].
- [29] Nikon Instruments Europe B.V., “CFI60 Water Dipping Series Microscope Objective Lenses,” 2016. [Online]. Available: https://www.nikoninstruments.com/en_DE/Products/Optics/Water-Dipping-Objectives/CFI60-Water-Dipping-Series/Specifications. [Accessed: 15-Sep-2016].
- [30] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook: Fundamentals, Devices, and Techniques*. Boca Raton: CRC press - Taylor & Francis Group, 2015.
- [31] S. W. Hell and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated

emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,” vol. 19, no. 11, pp. 780–782, 1994.

- [32] R. Tsien, “The Green Fluorescent Protein,” *Biochemistry*, vol. 67, pp. 509–544, 1998.
- [33] U. Krzic, “Multiple-view microscopy with light-sheet based fluorescence microscope,” no. July, p. 155, 2009.
- [34] C. Ernst, L. Meyer, G.-D. Schmidt, and O. Schwarz, *Formeln und Tabellen für die Sekundarstufe II*, 2nd ed. Berlin: paetec Gesellschaft für Bildung und Technik mbH, 2002.
- [35] D. V Bennett and M. B. Ahrens, “A Practical Guide to Light Sheet Microscopy,” *Methods Mol. Biol. (Clifton, NJ)*, vol. 1451, pp. 321–331, 2016.
- [36] P. R. Griffiths and J. A. de Haseth, *Fourier transform infrared spectrometry*, Second Edi. New Jersey: Wiley, 2007.
- [37] H. M. Padilla-nash, L. Barenboim-stapleton, M. J. Difilippantonio, and T. Ried, “Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes,” vol. 1, no. 6, pp. 3129–3142, 2007.
- [38] J. Zhao and R. L. McCreery, “Multichannel fourier transform Raman spectroscopy: Combining the advantages of CCDs with interferometry,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 50, no. 9, pp. 1209–1214, 1996.
- [39] R. G. Sellar and G. D. Boreman, “Limiting aspect ratios of Sagnac interferometers,” *Opt. Eng.*, vol. 42, no. 11, pp. 3320–3325, 2003.
- [40] Y. Ferrec, J. Taboury, H. Sauer, and P. Chavel, “Optimal geometry for Sagnac and Michelson interferometers used as spectral imagers,” *Opt. Eng.*, vol. 45, no. 11, pp. 1156011–1156016, 2006.
- [41] W. Müller, R. Heintzmann, and M. Kielhorn, “Stabiles Interferometer mit hoher Étendue, insbesondere für bildgebende Fourier-Transformations-Spektroskopie ohne Objektabrasterung,” DE 10 2014 011 668 A1, 2014.
- [42] I. Filmetrics, “Brechungsindex von Schott N-BK7,” 2016. [Online]. Available: <http://www.filmetrics.de/refractive-index-database/Schott+N-BK7>. [Accessed: 12-Sep-2016].
- [43] SCHOTT, “SCHOTT Optisches Glas Datenblätter,” 2015. [Online]. Available: http://www.schott.com/advanced_optics/german/abbe_datasheets/schott-datasheet-all-german.pdf. [Accessed: 15-Sep-2016].
- [44] M. Banzi, D. Cuartielles, T. Igoe, G. Martino, and D. Mellis, “Arduino MEGA 2560 & Genuino MEGA 2560,” 2016. [Online]. Available: <https://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardMega2560>. [Accessed: 12-Sep-2016].
- [45] P. Gregorcic, T. Pozar, and J. Mozina, “Quadrature phase-shift error analysis using a homodyne laser interferometer,” *Opt. Express*, vol. 17, no. 18, pp. 16322–16331, 2009.
- [46] P. dr. ir. L. J. van Vliet, “DIPlib & DIPimage,” 2009. [Online]. Available:

<http://www.diplib.org/>. [Accessed: 12-Sep-2016].

- [47] L. Mertz, "Auxiliary computation for Fourier spectrometry," *Infrared Phys.*, vol. 7, no. 1, pp. 17–23, 1967.
- [48] M. L. Forman, W. H. Steel, and G. a. Vanasse, "Correction of Asymmetric Interferograms Obtained in Fourier Spectroscopy," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 56, no. 1, pp. 59–63, 1966.
- [49] D. B. Chase, "Phase Correction in FT-IR," *Appl. Spectrosc.*, vol. 36, no. 3, pp. 240–244, 1982.
- [50] X. Xingsheng, M. Hai, Z. Qijing, and Z. Yunsheng, "Properties of Raman spectra and laser-induced birefringence in polymethyl methacrylate optical fibres," *J. Opt. A Pure Appl. Opt.*, vol. 4, no. 3, pp. 237–242, 2002.
- [51] U. Leischner, A. Schierloh, W. Zieglgänsberger, and H. U. Dodt, "Formalin-induced fluorescence reveals cell shape and morphology in biological tissue samples," *PLoS One*, vol. 5, no. 4, pp. 1–8, 2010.
- [52] J. Fehrenbach, P. Weiss, and C. Lorenzo, "Variational algorithms to remove stationary noise: Applications to microscopy imaging," *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 21, no. 10, pp. 4420–4430, 2012.
- [53] U. Krzic, S. Gunther, T. E. Saunders, S. J. Streichan, and L. Hufnagel, "Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 730–733, 2012.
- [54] Q. Sun, "The Raman OH stretching bands of liquid water," *Vib. Spectrosc.*, vol. 51, no. 2, pp. 213–217, 2009.
- [55] M. Miljković, T. Chernenko, M. J. Romeo, B. Bird, C. Matthäus, and M. Diem, "Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets.," *Analyst*, vol. 135, no. 8, pp. 2002–13, 2010.
- [56] M. Hedegaard, C. Matthäus, S. Hassing, C. Krafft, M. Diem, and J. Popp, "Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging," *Theor. Chem. Acc.*, vol. 130, no. 4–6, pp. 1249–1260, 2011.
- [57] H. Li, T. Adal, W. Wang, D. Emge, A. Cichocki, and A. Cichocki, "Non-negative Matrix Factorization with Orthogonality Constraints and its Application to Raman Spectroscopy," *J. VLSI Signal Process. Syst. Signal Image. Video Technol.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 83–97, 2007.
- [58] D. Lee and H. Seung, "Algorithms for non-negative matrix factorization," *Neural Inf. Process. Syst. Proc.*, no. 1, 2000.
- [59] P. J. Verveer and T. M. Jovin, "Image restoration based on Good's roughness penalty with application to fluorescence microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 15, no. 5, pp. 1077–1083, 1998.
- [60] J. Nocedal and S. J. Wright, *Numerical Optimization*, vol. 43, no. 2. 1999.
- [61] A. Jost, E. Tolstik, P. Feldmann, K. Wicker, A. Sentenac, and R. Heintzmann, "Optical

Sectioning and High Resolution in Single-Slice Structured Illumination Microscopy by Thick Slice Blind-SIM Reconstruction.," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132174, 2015.

- [62] P. J. Verveer, M. J. Gemkow, and T. M. Jovin, "A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy," *J. Microsc.*, vol. 193, no. July 1998, pp. 50–61, 1999.
- [63] F. Soulez, L. Denis, Y. Tourneur, and E. Thiebaut, "Blind deconvolution of 3D data in wide field fluorescence microscopy," *2012 9th IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging*, pp. 1735–1738, 2012.
- [64] P. V. and L. M. Joke De Gelder, Kris De Gussem, "Reference database of Raman spectra of biological molecules," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 38, no. April, pp. 1133–1147, 2007.
- [65] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, "Raman Spectroscopy of Biological Tissues," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 42, no. 5, p. 493 — 541, 2007.
- [66] D. Meschede, *Gerthsen Physik*, 24. Auflag. Heidelberg: Springer, 2010.
- [67] H. Gross, W. Singer, and M. Totzeck, *Handbook of optical systems, Fundamentals of Technical Optics*, vol. 1. Weinheim: Wiley Online Library, 2005.
- [68] R. G. Sellar and G. D. Boreman, "Comparison of relative signal-to-noise ratios of different classes of imaging spectrometer.," *Appl. Opt.*, vol. 44, no. 9, pp. 1614–1624, 2005.
- [69] F. D. Kahn, "The Signal: Noise Ratio of a Suggested Spectral Analyzer.," *The Astrophysical Journal*, vol. 129. American Astronomical Society, pp. 518–520, 1959.
- [70] D. S. Richardson and J. W. Lichtman, "Clarifying Tissue Clearing," *Cell*, vol. 162, no. 2, pp. 246–257, 2015.
- [71] B.-C. Chen, W. R. Legant, K. Wang, L. Shao, D. E. Milkie, M. W. Davidson, C. Janetopoulos, X. S. Wu, J. a. Hammer, Z. Liu, B. P. English, Y. Mimori-Kiyosue, D. P. Romero, A. T. Ritter, J. Lippincott-Schwartz, L. Fritz-Laylin, R. D. Mullins, D. M. Mitchell, A.-C. Reymann, J. N. Bembenek, R. Bohme, S. W. Grill, J. T. Wang, G. Seydoux, U. S. Tulu, D. P. Kiehart, and E. Betzig, "Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution," *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6208, pp. 12579981–125799812, 2014.
- [72] E. Baumgart and U. Kubitscheck, "Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection," *Opt. Express*, vol. 20, no. 19, pp. 21805–21814, 2012.
- [73] J. Huisken and D. Y. R. Stainier, "Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM).," *Opt. Lett.*, vol. 32, no. 17, pp. 2608–2610, 2007.
- [74] K. Watanabe, A. F. Palonpon, N. I. Smith, L. Chiu, A. Kasai, H. Hashimoto, S. Kawata, and K. Fujita, "Structured line illumination Raman microscopy," *Nat. Commun.*, no. May, pp. 1–8, 2015.
- [75] G. and others Bacon, R and Adam, G and Baranne, A and Courtes, G and Dubet, D and Dubois, JP and Emsellem, E and Ferruit, P and Georgelin, Y and Monnet, "3D

- spectrography at high spatial resolution. I. Concept and realization of the integral field spectrograph TIGER.," *Astron. Astrophys. Suppl. Ser.*, vol. 113, pp. 347–357, 1995.
- [76] R. Bacon, Y. Copin, and G. Monnet, "The SAURON project I. The panoramic integral field spectrograph," *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, vol. 35, pp. 23–35, 2001.
- [77] E. A. Zegarra Valverde, "Light Sheet Integral Field Raman Microspectroscopy," Abbe School of Photonics der Physikalisch-Astronomischen Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2016.
- [78] Nanophoton, "Laser Raman Microscope RAMANtouch," 2015. [Online]. Available: <http://www.eng.nanophoton.jp/products/ramantouch/index.html>. [Accessed: 12-Oct-2016].
- [79] C. J. R. Sheppard and T. Wilson, "Image Formation in Scanning Microscopes with Partially Coherent Source and Detector," *Opt. Acta Int. J. Opt.*, vol. 25, no. 4, pp. 315–325, 1978.
- [80] J. Mertz, *Introduction to Optical Microscopy*. Greenwood Village, Colorado: Robert and Company Publishers, 2010.
- [81] T. Wilson and A. R. Carlini, "Three-dimensional imaging in confocal imaging systems with finite sized detectors," *J. Microsc.*, vol. 149, no. 1, pp. 51–66, 1988.
- [82] H. Shuman, "Contrast in confocal scanning microscopy with a finite detector," *J. Microsc.*, vol. 149, pp. 67–71, 1988.
- [83] A. Jost and R. Heintzmann, "Superresolution Multidimensional Imaging with Structured Illumination Microscopy," *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 43, no. 0, pp. 261–282, 2013.
- [84] S. Abrahamsson, J. Chen, B. Hajj, S. Stallinga, A. Y. Katsov, J. Wisniewski, G. Mizuguchi, P. Soule, F. Mueller, C. D. Darzacq, X. Darzacq, C. Wu, C. I. Bargmann, D. A. Agard, M. Dahan, and M. G. L. Gustafsson, "Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 1, pp. 60–63, 2012.
- [85] S. Abrahamsson, M. McQuilken, S. B. Mehta, A. Verma, J. Larsch, R. Ilic, R. Heintzmann, C. I. Bargmann, A. S. Gladfelter, and R. Oldenbourg, "MultiFocus Polarization Microscope (MF-PolScope) for 3D polarization imaging of up to 25 focal planes simultaneously," *Opt. Express*, vol. 23, no. 6, p. 7734, 2015.
- [86] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Third Edit. Burlington: Academic Press, 2008.
- [87] Roth, "Sicherheitsdatenblatt: Agarose HEEO Ultra-Qualität Roti®garose für die Elektrophorese." Carl Roth, Karlsruhe, pp. 1–10, 2016.
- [88] J. E. Bertie and Z. Lan, "Infrared Intensities of Liquids XX," *Appl. Spectrosc.*, vol. 50, no. 8, pp. 1047–1057, Aug. 1996.
- [89] J. W. Dobrucki, D. Feret, and A. Noatynska, "Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies.," *Biophys. J.*, vol. 93, no. 5, pp. 1778–1786, 2007.
- [90] K. Burg, H. Haf, F. Wille, and A. Meister, *Partielle Differentialgleichungen und*

funktionalanalytische Grundlagen, 5th ed. Berlin: Vieweg+Teubner Verlag, 2010.

- [91] B. Schweizer, *Partielle Differentialgleichungen: Eine anwendungsorientierte Einführung*. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum, 2013.
- [92] M. L. V Ramires, C. A. Nieto de Castro, Y. Nagasaka, A. Nagashima, M. J. Assael, and W. A. Wakeham, "Standard reference data for the thermal conductivity of water," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 24, no. 3, pp. 1377–1381, 1995.
- [93] MathWorks, "Partial Differential Equation Toolbox," 2016. [Online]. Available: <https://de.mathworks.com/help/pde/index.html>. [Accessed: 22-Nov-2016].
- [94] L. Van Vliet, D. Sudar, and I. Young, "Digital Fluorescence Imaging Using Cooled CCD Array Cameras invisible," *J.E. Celis(eds); Cell Biol. Second Eddition , Vol. III, Acad. Press New York*, vol. III, no. Castleman 1996, pp. 109–120, 1998.
- [95] B. E. A. Saleh and M. C. Teich, *Grundlagen der Photonik*. John Wiley & Sons, 2008.
- [96] Michael Bass, C. Decusatis, and J. Enoch, *Handbook of Optics, Volume I: Geometrical and Physical Optics, Polarized Light, Components and Instruments*, 3rd ed. New York: Mcgraw Hill Book Co, 2009.
- [97] A. Gorman, D. W. Fletcher-Holmes, and A. R. Harvey, "Generalization of the Lyot filter and its application to snapshot spectral imaging.," *Opt. Express*, vol. 18, no. 6, pp. 5602–5608, 2010.
- [98] L. Gao, N. Bedard, N. Hagen, R. T. Kester, and T. S. Tkaczyk, "Depth-resolved image mapping spectrometer (IMS) with structured illumination," *Opt. Express*, vol. 19, no. 18, p. 17439, 2011.
- [99] E. Schmäzlin, B. Moralejo, M. Rutowska, A. Monreal-Ibero, C. Sandin, N. Tarcea, J. Popp, and M. M. Roth, "Raman imaging with a fiber-coupled multichannel spectrograph," *Sensors (Switzerland)*, vol. 14, no. 11, pp. 21968–21980, 2014.
- [100] L. Gao, R. T. Kester, and T. S. Tkaczyk, "Compact Image Slicing Spectrometer (ISS) for hyperspectral fluorescence microscopy.," *Opt. Express*, vol. 17, no. 15, pp. 12293–12308, 2009.
- [101] T. O. I. Yamaguchi, "Simultaneous acquisition of spectral image information," *Opt. Lett.*, vol. 16, no. 16, pp. 1277–1279, 1991.
- [102] D. Zopf, J. Jatschka, A. Dathe, N. Jahr, W. Fritzsche, and O. Stranik, "Hyperspectral imaging of plasmon resonances in metallic nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 81, pp. 287–293, 2016.
- [103] S. Blais-Ouellette, O. Daigle, and K. Taylor, "The imaging Bragg Tunable Filter: A new path to integral field spectroscopy and narrow band imaging," vol. 6269 II, p. 62692G, 2006.
- [104] S. Marcet, M. Verhaegen, S. Blais-Ouellette, and R. Martel, "Raman spectroscopy hyperspectral imager based on Bragg tunable filters," *Proc. SPIE*, vol. 8412. p. 84121J–84121J–7, 2012.

7. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 bis Abbildung 34 und die Abbildungen aus den Tabellen: Tabelle 3, Tabelle 6, Tabelle 13 und Tabelle 15 wurden von Walter Müller erstellt.

- Abbildung 1: links: Typischer Aufbau eines Raman-Mikrospektrometers, rechts: schematisches Raman-Spektrum mit spektralen Bändern für biologisches Gewebe.....11
- Abbildung 2: Vergleich der Beleuchtungsgeometrie von konfokalem Mikroskop und Lichtschichtmikroskop. Es ist zu erkennen, dass die Bestrahlungsenergie während des Bildgebungsprozesses nur bei der Lichtschichtbeleuchtung außerhalb des Fokus der hoch NA Detektionsoptik abnimmt.....14
- Abbildung 3: Kombination des Nikon CFI Plan Fluor W 10×; NA: 0,30 zur Beleuchtung und des Nikon CFI Achromat 40× W NIR; NA: 0,80 zur Detektion. Die Konstruktionszeichnungen der beiden Objektive sind aus dem jeweiligen Herstellerdatenblatt entnommen [29]. ...17
- Abbildung 4: Beleuchtung des Sichtfeldes FOV in der Probe mit einem elliptischen Gauß-Strahl.....19
- Abbildung 5: Aufbau zur Generierung der Lichtschicht. gelb: Strahlenverlauf der Beleuchtung über eine Lambda-Halbe-Platte, eine Zylinderlinse, eine 4f-Relais-Optik mit zwei justierbaren Spiegeln und ein Wassertauchobjektiv (10×; 0,3 NA); rot: Strahlenverlauf für eine einfache, breitbandige Detektion mit einem zweiten Wassertauchobjektiv (40×; 0,8 NA).....21
- Abbildung 6: Telezentrisches 4f-Abbildungssystem mit Interferometer im Unendlich-Strahlengang.....23
- Abbildung 7: Stabiles Interferometer bestehend aus zwei konstruktiv reduzierten Retroreflektoren und zwei Strahlteilerwürfeln ST (links: perspektivische Ansicht (modifiziert nach [25]), rechts: Draufsicht enger Anordnung).....24
- Abbildung 8: rechts: Frontansicht eines Retroreflektors mit Darstellung der sechs Sektoren und der Bereiche, die im Interferometer für optische Strahlung verwendet werden. Der graue Bereich wird nicht für die Retroreflexion benötigt und kann daher abgeschnitten werden. links: Seitenansicht.....24
- Abbildung 9: Aufgefaltete Darstellung des Interferometers in einem der beiden Interferometerarme. v.l.n.r: erster Strahlteilerwürfel mit Brechungsindex n , Lücke mit Brechungsindex 1, aufgefalteter Tripelspiegel als Glaszylinder mit Brechungsindex n , Lücke mit Brechungsindex 1, zweiter Strahlteilerwürfel mit Brechungsindex n27

Abbildung 10: Aufgefaltete Darstellung eines Armes des Interferometers mit einem um A ausgedehnten Strahlenbündel und zusätzlichen $1:\infty$ Abbildungsoptiken (blau). Die Apertur A befindet sich in der Mitte des Retroreflektors (entlang der optischen Achse). (modifiziert nach [25])	28
Abbildung 11: Regelschleife für die aktive Stabilisierung der optischen Weglänge im Interferometer: Interferometer (blau), Referenzlaser (grün), Komponenten der Regelschleife (schwarz), Richtung der Regelschleife (rot), Kamera und Motor für die Probenpositionierung (grau).....	30
Abbildung 12: Einfache Unterabtastung der Interferenz am Ausgang des Interferometers mit typischen Raman- und Fluoreszenzsignalen. Das Pseudosignal (Ps.) nahe der Nullfrequenz entsteht durch langsame, zeitliche Veränderungen in der Probe. (modifiziert nach [25])	32
Abbildung 13: Optischer Aufbau aus Lichtschichtbeleuchtung (gelb) und stabilem Interferometer (rot). Der Retroreflektor 2 ist frei verschiebbar auf der piezomotorisierten Bühne angebracht. Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Helium-Neonlaser (543 nm) nicht dargestellt. (modifiziert nach [25])	34
Abbildung 14: Halterung der in Agarose eingebetteten Probe (rotes S) in einem löffelförmigen Halter aus Aluminium (waagerechte Darstellung). Zusätzlich dargestellt sind das beobachtende Mikroskop-Objektiv und die Lichtschicht. (modifiziert nach [25])	35
Abbildung 15: Prinzip der Phasenkorrektur der gewonnenen Spektren am Beispiel von verschiedenen Signalintensitäten (links: mittel, Mitte: schwach, rechts: extrem schwach). Die Phasenkorrektur schätzt die tatsächliche Phase (grau) durch Mittelung über die Phase mehrerer, rauschender Voxel aus dem hyperspektralen Bild (blau) ab und liefert für starke bis schwache Signale ein zuverlässiges Ergebnis Re' (rot). Durch anschließendes Bilden des Real-teils werden alle Voxel (blau) in Richtung des neuen Realteils Re' (rot) abgebildet.	40
Abbildung 16: Entstehung der transversalen Positionsabhängigkeit der Abtastperiode der OPD.	42
Abbildung 17: Reduktion von Schatten in der Lichtschichtbeleuchtung mittels Division durch das Wassersignal. Das Verfahren ist am Beispiel des Auges eines Zebrafischembryos (<i>Danio rerio</i>), eingebettet in 2% Standard-Agarose, aufgenommen mit einer Bestrahlungsstärke von $870 \mu W \mu m^2$ über 1 h 8 min und spektraler Auflösung von $4,4 \text{ cm}^{-1}$, gezeigt. (a) Raman-Signal im Wellenzahlbereich zwischen 2941 cm^{-1} und 3017 cm^{-1} (b) Raman-Signal im Wellenzahlbereich zwischen 2851 cm^{-1} und	

2910 cm^{-1} **(c)** Wassersignal im Bereich zwischen 3247 cm^{-1} und 3826 cm^{-1} , **(d)** Schattenreduktion durch Division von (a) durch (c), **(e)** Division von (b) durch (c). (nach [25])44

Abbildung 18: LSRM an einer Probe aus 2,2 μm PS- und 6,0 μm PMMA-Kugeln. **(a)** 2048 \times 2048 Raman-Spektren mit 18 cm^{-1} Auflösung und einer Gesamtbelichtungszeit von 3,5 min: (rot) Ringatmungsmodus von PS im Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1018 cm^{-1} , (grün) C-H Streckschwingung von PMMA im Bereich zwischen 2941 cm^{-1} und 2959 cm^{-1} und (blau) Wassersignal im Bereich zwischen 3193 cm^{-1} und 3660 cm^{-1} ; **(b)** Mittel aller Spektren von PS (rot) und PMMA (blau) mit 4,4 cm^{-1} spektraler Auflösung entsprechend 14 min Belichtungszeit; **(c)** einzelnes Spektrum aus einer Millionen (2×2 gebinnter) Spektren mit 4,4 cm^{-1} spektraler Auflösung von PS (rot) und PMMA (blau) (modifiziert nach [25])50

Abbildung 19: LSRM in Abhängigkeit von der Polarisierung der Beleuchtung. **(a)** PS-Kugeln und **(b)** PMMA-Kugeln beleuchtet mit der Polarisationsrichtung in der Lichtschicht 0° (rot) und orthogonal zur Lichtschicht 90° (blau) (modifiziert nach [25])52

Abbildung 20: Durch NMF extrahierte Raman-Spektren des Auges eines Zebrafischembryos. Die spektrale Auflösung beträgt 4,4 cm^{-1} . Die Graphen zeigen das Ergebnis der multiplikativen Aktualisierungsregeln nach 250 000 Iterationen. (modifiziert nach [25]) 53

Abbildung 21: Entmischtes 3D-Raman-Bild des Auges eines Zebrafischembryos. Die einzelnen Farbkanäle korrespondieren mit den extrahierten Spektren aus Abbildung 20. Die Raman-Signatur passt zum Spektrum von: (rot) Proteinen wie Kollagen, (grün) Lipiden, (blau) Desoxyribonukleinsäure (DNS). **(a)** Ausgewählte xy-Ebene aus dem 3D hyperspektralen Bild mit 18 cm^{-1} spektraler Auflösung **(b)** wie (a) jedoch nach 3D-Entfaltung jedes Farbkanals. **(c)** Ausgewählte yz-Ebene **(d)** Ausgewählte xz-Ebene. (nach [25])53

Abbildung 22: Vergleich der Signal-Rausch-Verhältnisse (SNR) des LSRMs mit dem eines dem Stand der Technik entsprechenden konfokalen Raman-Mikroskops anhand der Raman-Spektren der kollagenreichen Augenlinse einer fixierten Zebrafischprobe gemittelt über 1 μm^2 . **Grün:** gemittelte spektrale LSRM-Daten aus 6×6 Rohpixeln ($1 \mu m \times 1 \mu m$). Die äquivalente Belichtungszeit bezogen auf eine pixelweise Abtastung entspricht 39 ms. **Rot:** wie grün, jedoch tiefpassgefiltert mit einem Gaußfilter mit $\sigma = 4,4 \text{ cm}^{-1}$. **Blau:** gemittelte spektrale Daten des konfokalen Mikroskops aus 2×2 Rohpixeln ($1 \mu m \times 1 \mu m$) mit einer Belichtungszeit von 175 ms. Vergleiche die Form des Peaks bei

1001 cm^{-1} und das Rauschen im Wasserband zwischen 3200 cm^{-1} und 3500 cm^{-1} . (modifiziert nach [25])	56
Abbildung 23: Symbolische Darstellung eines allgemeinen Mikrospektrometers. Bei den Bestandteilen handelt es sich um logische Komponenten, die für ein bestimmtes Mikrospektrometer physikalisch miteinander verbunden sein können.	62
Abbildung 24: Optisches System eines verallgemeinerten Mikroskops. Die Beleuchtung und Detektion können am Koordinatenbruch in einem Winkel zueinander stehen, um neben Durchlicht- auch Dunkelfeld- und Reflexionsgeometrien zu ermöglichen. Da eine Vergrößerung nur eine zusätzliche Koordinatentransformation erfordert, wird diese hier der Einfachheit halber auf eins festgelegt.	64
Abbildung 25: Allgemeines Spektrometer. Die spektrale Strahldichte $L(x, y, \theta, \varphi, \nu)$, ausgehend von einer Probe am Ort x, y , wird unter einem Raumwinkel Ω über eine Zeit T gesammelt. Durch die Encodierung mit der Durchlässigkeitsfunktion Dx, y, ν, t geht Licht verloren und es bleibt die spektrale Fluenz Hx, y, ν zu vermessen. Dies geschieht durch die Aufnahme von einem oder mehreren Rohdatenbildern Ri, j, nt mit je der Belichtungszeit τ . Nach einer Decodierung steht ein hyperspektrales Bild Bx, y, ν zur Verfügung.....	72
Abbildung 26: Projektion der Durchlässigkeitsfunktion Dx, y, ν, t für linienweise Abtastung (links) und für rahmenweise, filterbasierte Spektrometer (rechts) mit Achsen für Zeit t , Frequenz ν und Ort y . Die grauen Flächen zeigen die Orte, an denen D transparent ($D = 1$ sonst 0) ist.	73
Abbildung 27: links: homogene und würfelförmige Probe mit der Kantenlänge $2l$ im Wärmebad der Temperatur u_0 und mit symmetrischer Beleuchtung eines konfokalen Mikroskops, rechts: Zeitverlauf der Beleuchtung mit der Beleuchtungsdauer T	84
Abbildung 28: Beleuchtung und Temperatur einer $l = 100 \mu m$ Probe in einem linienkonfokalen Mikroskop, links: triangulierte Intensitätsverteilung (log) in 2D eines Gauß-Strahls mit 0,8 NA und Ausbreitungsrichtung in x , rechts: normierte Temperaturverteilung im thermisch stationären Zustand. Da $\mu a = 1$ gewählt wurde, ergibt der Kehrwert des Maximums bei $x = y = 0$ den Temperaturfaktor uf	94
Abbildung 29: Normierte Temperaturverteilung in einer $l = 100 \mu m$ Probe in einem linienkonfokalen Mikroskop, links: nach 488 μs , rechts: im thermisch stationären Zustand.....	95
Abbildung 30: Temperaturfaktor uf in Abhängigkeit der Beleuchtungsdauer T . Durchgezogene Linien gelten für unendlich ausgedehnte Proben, gestrichelte Linien für	

Proben mit der Kantenlänge $2l \times 2l \times \infty$ bei Linienkonfokal und Lichtlinie und $2l \times \infty \times \infty$ bei Lichtschicht. Die Ergebnisse für endliche Proben sind mit Hilfe der FEM errechnet. Die Ergebnisse für unendliche Proben von Weitfeld-, Lichtschicht- und Lichtlinienmikroskop sind analytisch, für Konfokal- und Linienkonfokalmikroskop numerisch berechnet. Die analytisch gefundenen thermisch stationären Zustände für die Lichtschicht und das kollimierte Strahlenbündel (Kapitel 3.4.3.) stimmen mit denen der FEM überein. 96

Abbildung 31: SNR-Faktor für Mikrospektrometer in Abhängigkeit der totalen Messzeit T für 1000×1000 Bildpunkte und 1000 Spektralkanäle. Durchgezogene Linien gelten für unendlich ausgedehnte Proben, gestrichelte Linien für Proben mit der Kantenlänge $2l \times 2l \times \infty$ bei Linienkonfokal und Lichtlinie und $2l \times \infty \times \infty$ bei Lichtschicht. Das konfokale, linienkonfokale und Lichtlinienmikroskop ist mit einem dispersiven punkt- bzw. zeilenweise abtastenden Spektrometer gekoppelt. Das Lichtschichtmikroskop ist zum einen an ein (interferometrisches) Fourier-Transformations-Spektrometer (FT) wie in Kapitel 2., zum anderen an ein (panchromatisches) integrales Feldspektrometer (IF) gekoppelt. Das Weitfeldmikroskop ist an ein veränderliches Bandfilter gekoppelt. Detektorrauschen und Rauschen von nicht fokussiertem Licht wurde vernachlässigt ($qS = 0$). 101

Abbildung 32: wie Abbildung 31, jedoch für 50×50 Bildpunkte 101

Abbildung 33: Schematische Intensitätsprofile des elliptischen Gauß-Strahls in x-Richtung. (links) Draufsicht und Seitenansicht, (rechts) Querschnitte für $x = 0$ und eine beliebige Position. Die Koordinaten und Visualisierungsparameter sind entsprechend einer Lichtschichtbeleuchtung mit der Ausbreitungsrichtung x und der Blickrichtung z gewählt. 108

Abbildung 34: Abtastschema eines fensterweise abtastenden, filterbasierten Spektrometers 119

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Typische Parameter bei der Messung mit einem konfokalen Raman-Mikroskop..	11
Tabelle 2: Übersicht über Eigenschaften der aufgebauten Lichtschichtbeleuchtung.....	20
Tabelle 3: Justierfreiheitsgerade der Lichtschicht (grün) in der Probe. Die Großbuchstaben korrespondieren mit der Abbildung des Aufbaus.....	22
Tabelle 4: Experimentelle Parameter des entwickelten LSRMs im Vergleich zum konfokalen Raman-Mikroskop für den Methodenvergleich anhand der Augenlinse eines Zebrafischembryos.....	55
Tabelle 5: Einteilung bildgebender Spektrometer anhand: Methode der spektralen Codierung	70
Tabelle 6: Einteilung bildgebender Spektrometer anhand: Methode der örtlichen Codierung	71
Tabelle 7: Signalfaktoren S_f und SNR-Faktoren SNR_f verschiedener Klassen bildgebender Spektrometer für örtlich 3-dimensionale Proben	79
Tabelle 8: Parameter der elliptischen partiellen Differentialgleichung in Matlab zur Lösung des Wärmeleitungsproblems im thermisch stationären Zustand	92
Tabelle 9: Parameter der parabolischen partiellen Differentialgleichung in Matlab zur Lösung des Wärmeleitungsproblems für die begrenzte Diffusion.....	93
Tabelle 10: Parameter zur Steuerung des iterativen Algorithmus „adaptmesh“	94
Tabelle 11: Definition der Beleuchtungsgeometrien (vergleiche auch Anhang A5.)	96
Tabelle 12: Zusammenhang zwischen der totalen Messzeit T für ein hyperspektrales 3D-Bild und der Beleuchtungsdauer T an einer Stelle der Probe (für die Belichtungszeit τ vergleiche auch Anhang A8.)	98
Tabelle 13: Übersicht über verschiedene Beleuchtungsgeometrien	111
Tabelle 14: Bildgebende Spektrometer nach Methoden spektraler und örtlicher Codierung geordnet.....	117
Tabelle 15: Vergleich der Abtastprozesse verschiedener Klassen bildgebender Spektrometer	118

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- 1.) Hilfe bei der Mikroskopie eines fixierten Zebrafischembryos an einem konfokalen Raman-Mikroskop am Universitätsklinikum Jena durch Dr. Christian Matthäus

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Physikalisch-Astronomischen Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, 23.05.2017

Ort, Datum

.....

Walter Müller