

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, ZNP)
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Armin Giese

Und dem Laser-Forschungslabor
Klinikum der Universität München
Wissenschaftlicher Leiter: Priv. Doz. Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka

Zwei-Photonen-Endomikroskopie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von

Katharina Thomsen

aus
München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Herms

Mitberichterstatter: apl. Prof. Dr. Karl-Hans Englmeier
Priv. Doz. Dr. Daniel Kook

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Herbert Stepp

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2015

Für meinen Mann und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ix
Abstract	xi
1 Theorie	2
1.1 Klinische Anwendung von hochauflösender Endomikroskopie	2
1.2 Stand der Technik der Zwei-Photonen-Endomikroskopie	4
1.2.1 Hochauflösende Mikroskopieverfahren	4
1.2.1.1 Konfokal-Mikroskopie	4
1.2.1.2 Zwei-Photonen-Mikroskopie	7
1.2.2 Hochauflösende Endomikroskopie-Verfahren	8
1.3 Ultrakurzzeitoptik	13
1.3.1 Das Wellenpaket	14
1.3.2 Das komplexe elektrische Feld	14
1.3.2.1 Instantane Frequenz und gechirpte Pulse	15
1.3.2.2 Messgrößen der optischen Pulse	15
1.3.3 Gaußpuls	18
1.3.4 Pulsausbreitung	20
1.3.4.1 Pulsausbreitung im linearen Regime	21
1.3.4.2 Pulsausbreitung im nichtlinearen Regime	24
1.3.5 Pulskompression	27
2 Material und Methoden	31
2.1 Aufbau Zwei-Photonen-Mikroskop	31
2.2 Laserquellen	32
2.2.1 Ultrakurze Laserquellen für Zwei-Photonen-Anregung	32
2.2.2 Laserquellen zur Justage und konfokalen Detektion	33
2.3 Scannerkopf	34
2.4 Einkoppeloptik	35
2.5 Lichtwellenleiter	36
2.6 Distale Optik	39
2.6.1 Mikrooptik	39
2.6.2 Referenzsystem	39
2.6.3 Auflösung	40
2.7 Fluoreszenzlichtdetektion und Bilderfassung	40
2.8 Pulskompressor	41
2.9 Autokorrelator	43
2.10 Simulation	45

2.11	Gewebeproben und Färbung	47
2.12	Variable Fokussiereinheit	48
2.12.1	Anforderungen und Konzepte	48
2.12.2	Konzept auf Basis von Formgedächtnislegierung	50
2.12.3	Eigenschaften von Nitinol	52
2.12.4	Versuchsanordnung	53
2.12.5	Spannungsapplikation	54
2.12.6	Bestimmung der Kontraktion des Nitinoldrahts	55
3	Ergebnisse und Diskussion	57
3.1	Systemcharakterisierung	57
3.1.1	Charakterisierung der Einkoppeloptik	57
3.1.1.1	Zemaxsimulation	57
3.1.1.2	Messungen	61
3.1.1.3	Diskussion	61
3.1.2	Distale Optik	62
3.1.2.1	Laterale Auflösung	62
3.1.2.2	Axiale Auflösung	63
3.1.2.3	Bildfeld	63
3.1.2.4	Diskussion	64
3.1.3	Transmission	66
3.1.3.1	Diskussion	67
3.2	Variable Fokussiereinheit	68
3.2.1	Realsisierung der Versuchsanordnung	68
3.2.2	Bestimmung der Kontraktion des Nitinoldrahts	69
3.2.2.1	Bestimmung der maximalen Verstellung	70
3.2.2.2	Bestimmung der relativen Verstellung	71
3.2.2.3	Reproduzierbarkeit	72
3.2.3	Diskussion	73
3.3	Pulspropagation	75
3.3.1	Laserparameter	75
3.3.2	Diskussion	76
3.3.3	Pulspropagation ultrakurzer Pulse durch Lichtwellenleiter	77
3.3.3.1	Verbreiterung der Pulsdauer	77
3.3.3.2	Verbreiterung des Spektrums	78
3.3.3.3	Diskussion	78
3.3.4	Pulspropagation negativ gechirpter Pulse durch Lichtwellenleiter	81
3.3.4.1	Charakterisierung des Pulskompressors	81
3.3.4.2	Pulspropagation negativ gechirpter Pulse durch Lichtwellenleiter	81
3.3.4.3	Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Anregung in Abhängigkeit des Prechirps	83
3.3.4.4	Diskussion	85
3.3.5	Simulationen	87
3.3.5.1	Lineare Dispersion	88
3.3.5.2	Nichtlineare Dispersion	88

3.3.5.3	Gitterkompressor	90
3.3.5.4	Simulation der Pulspropagation negativ gechirpter Pulse durch Lichtwellenleiter	90
3.3.5.5	Diskussion	94
3.4	Biologische Anwendung	97
3.4.1	Bilder	97
3.4.2	Diskussion	100
3.5	Ausblick	101

A Anhang

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Literaturverzeichnis	III
Ergänzungsmaterial	XI
Abkürzungsverzeichnis	XV
Symbolverzeichnis	XVII
Danksagung	XIX

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für die Zwei-Photonen-Endomikroskopie untersucht. Die Herausforderung liegt in der Miniaturisierung der Technik der Zwei-Photonen-Mikroskopie, um auch endoskopisch *in vivo* hochauflösende Bilder von Gewebestrukturen und Zellen zu erhalten. Im Gegensatz zur Gewebeentnahme bei einer Biopsie ist dieses optische Verfahren minimal-invasiv. Damit ist eine Vorab Untersuchung des Gewebes möglich, die die Diagnostik unter anderem von bösartigen Gewebestrukturen präzisieren könnte. Die konfokale Endoskopie bietet bereits mit einem vergleichbaren Verfahren die Möglichkeit einer optischen Biopsie an der Oberfläche, z.B. an verschiedenen Schleimhäuten. Aufgrund der Gewebestreuung ist die Eindringtiefe des Lichts dabei aber auf wenige Mikrometer begrenzt. Diese Einschränkung könnte durch die bereits in der Zwei-Photonen-Mikroskopie gezeigte größere optische Eindringtiefe durch die Zwei-Photonen-Endomikroskopie verbessert werden.

In dieser Arbeit wurde ein Femtosekundenlaser durch Glasfasern geleitet und am distalen Ende mit Hilfe einer Mikrooptik fokussiert. Dazu wurde ein Aufbau basierend auf Faserbündeln gewählt. Die einzelnen Faserkerne des Glasfaserbündels wurden mit einem Galvanometer-Scanner abgerastert und die dazugehörige detektierte Fluoreszenz punktweise zu einem Bild zusammengesetzt. Zur Kompensation der zeitlichen Verbreiterung der Pulse wurde ein Gitterkompressor aufgebaut. Mit diesem Aufbau wurden Zwei-Photonen-Fluoreszenz Aufnahmen von fluoreszenzstarken Proben durch ein Faserbündel ermöglicht. Diese Arbeit zeigt die Machbarkeit der Zwei-Photonen-Endoskopie und zeigt Möglichkeiten zur Optimierung, um zukünftig auch einen klinischen Einsatz zu ermöglichen. Mit der verwendeten Mikrooptik wurde eine zelluläre Auflösung von $(3,5 \pm 0,3) \mu\text{m}$ lateral und $(5,3 \pm 0,1) \mu\text{m}$ axial erreicht. Durch die Verwendung eines Referenzsystems aus Mikroskopobjektiven im Austausch der Mikrooptik konnte gezeigt werden, dass vor allem die laterale Auflösung noch verbessert werden konnte. Entscheidend ist hierfür eine hohe distale numerische Apertur. Der zukünftige Einsatz von verbesserten Mikrooptiken kann somit die Auflösung noch erhöhen. Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass diese zukünftig auch kommerziell erhältlich sein könnten. Zusätzlich wurde eine variable Fokussiereinheit auf Basis eines Drahts aus einer Formgedächtnislegierung (Nitinol) realisiert. Damit konnte der Abstand zwischen Mikrooptik und Gewebeoberfläche verstellt werden. Durch Applikation eines maximalen Stromes bis zu 385 mA kontrahiert der Nitinoldraht um ca. 1,8%. Ab dem minimalen Aktivierungsstrom von 330 mA konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Stromstärke und der Verschiebung beobachtet werden. Eine Änderung der Stromstärke in Schritten von 16–12 mA. ermöglicht eine Verschiebung von 20–10 μm .

Eine Herausforderung ist die Erzeugung und Detektion der Fluoreszenzsignale aus dem Gewebe zur Erzeugung von aussagekräftigen Zwei-Photonen-Bildern. Die Leistungsverluste der Laserenergie im Anregungsweg und die Verluste des

Fluoreszenzsignals im Detektionsweg müssen hierfür möglichst gering gehalten werden. Die größten Verluste im Anregungsweg gibt es durch den Gitterkompressor, durch die Fasereinkopplung und durch die Mikrooptik. Trotzdem ist die hier erreichte Gesamttransmission von 18% ($\lambda_0 = 800\text{ nm}$) ohne Gitterkompressor vergleichbar mit der erster Zwei-Photonen-Mikroskope. Durch Optimierung einzelner Komponenten, vor allem des Gitterkompressors und der Mikrooptik, ist zukünftig eine bessere Transmission möglich.

Die Erzeugung von Zwei-Photonen-Fluoreszenzsignalen wird auch durch die Pulsverbreiterung innerhalb des Faserbündels verringert. Sowohl lineare als auch nichtlineare Effekte verbreitern spektral und zeitlich die Pulse. Die Untersuchung dieser Effekte konnte zeigen, dass mit Hilfe eines Gitterkompressors die zeitliche Pulsdauer am Faserausgang bis auf ca. 10 fs wiederhergestellt werden konnte und damit die Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung verbessert werden konnte. Trotzdem konnten bereits bei den hier verwendeten Leistungen (5–65 mW) auch nichtlineare Effekte beobachtet werden. Dazu kommt, dass bei höheren Laserintensitäten keine Transmission mehr möglich ist und die Eigenfluoreszenz der einzelnen Fasern des Faserbündels die Fluoreszenzsignale aus dem Gewebe überlagert.

Zur Beseitigung der hier gezeigten Limitierungen durch die Mikrooptik und durch das Faserbündel sind weitere Optimierungen nötig um den Einsatz eines Zwei-Photonen-Endoskops *in vivo* zu ermöglichen. Durch den nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Photonenintensität und der Fluoreszenzanregung sind diese Limitierungen gravierender als bei einer normalen Fluoreszenzanregung. Eine Reduzierung der Spitzenintensitäten der Laserpulse bei einem gleichzeitigen Erhöhen der Laserrepetitionsrate könnte zukünftig die nichtlinearen Effekte reduzieren und die effektive Laserleistung am Faserausgang erhöhen.

Abstract

In the present thesis, the basis for two-photon endomicroscopy was examined. The challenge is to miniaturize the technique of two-photon microscopy to endoscopically obtain *in vivo* high-resolution images of tissue structures and cells. In contrast to tissue extraction during a biopsy this optical method is minimal-invasive. This optical method is minimally invasive, as no tissue, such as in a biopsy, has to be taken. Thus, a preliminary examination of the tissue is possible, which could increase the precision of the diagnosis of e.g. malignant tissue structures. Confocal endoscopy already enables to obtain optical biopsies at the tissue surface, for example at various mucous membranes, applying a similar method. Due to tissue scattering, the penetration depth of light is limited to a few micrometers. This limitation could be reduced by the higher optical penetration depth of the two-photon microscopy.

In this thesis a femtosecond laser was guided through a glass fiber and was focused at the distal end with a micro optic. For this purpose, a setup was selected based on fiber bundles. The individual cores of the fiber bundle were scanned with a galvanometer scanner and the associated fluorescence signal was detected pointwise to then compose one complete image. To compensate for the temporal pulse broadening a grating compressor was constructed. This setup enables two-photon fluorescence recordings of samples with a high fluorescence emission through a fiber bundle. This work demonstrates the feasibility of two-photon endoscopy and shows possibilities for optimizing in order to enable future clinical use. A cellular resolution of laterally $(3,5 \pm 0,3) \mu\text{m}$ and axially $(5,3 \pm 0,1) \mu\text{m}$ was achieved with the used micro-optic. Especially the lateral resolution could be improved by using a reference system composed of microscope objectives in the exchange of the micro-optics. Crucial for this is a high distal numerical aperture. The future use of improved micro-optics can thus increase the resolution. Recent research suggests that this could become commercially available in the future. In addition, a variable focusing unit was realized on the basis of a shape memory allow wire (nitinol wire). Thus, the distance between micro-optics and tissue surface could be changed. By applying a maximum current up to 385 mA the nitinol wire contracted by about 1,8%. A linear relationship between the current and the displacement could be observed beginning at the minimum activation current of 330 mA. A change of current in steps of 16–12 mA allows a displacement of 20–10 μm .

One challenge is the generation and detection of the fluorescent signals from the tissue to generate meaningful two-photon images. The power losses of the laser energy in the excitation path and the loss of the fluorescence signal in the detection path must be kept as low as possible for this purpose. The grating compressor, the fiber coupling and micro-optics cause the highest losses in the excitation path. The achieved total transmission of 18% ($\lambda_0 = 800 \text{ nm}$) without the grating compressor is nevertheless comparable with the total transmission of first two-photon microscopes. In future a

better transmission is possible through optimization of individual components, especially the grating compressor and micro-optics.

The pulse broadening through the fiber bundle also reduces the generation of two-photon fluorescence signals. Linear and non-linear effects spectrally and temporally broaden the pulses. The study of these effects showed that the temporal pulse duration could be restored to approximately 10 fs at the fiber output with the help of a grating compressor, and thus the two-photon fluorescence excitation could be improved. Nevertheless, already with the applied power (5–65 mW) nonlinear effects could be observed. In addition, at higher laser intensities no transmission is possible, and is superimposed on the self-fluorescence of the individual fibers of the fiber bundle, the fluorescence signals from the tissue.

Further improvements are necessary to eliminate the found limitations, which are caused by the micro-optics and the fiber bundle, to allow the use of a two-photon endoscope *in vivo*. These limitations are more serious than in normal fluorescence excitation, because of the non-linear dependency between the photon intensity and the fluorescence excitation. A reduction in the peak intensities of the laser pulses with a simultaneous increase of laser repetition rate could reduce the nonlinear effects and increase the effective laser power at the fiber output in future.

1 Theorie

1.1 Klinische Anwendung von hochauflösender Endomikroskopie

Mikroskopische Techniken ermöglichen es, Strukturen und dynamische Prozesse auf zellulärer Ebene sichtbar zu machen und sind daher ein wichtiges Diagnosewerkzeug in der Medizin und Biologie. Eine der wichtigsten Anwendungen der Mikroskopie in der Medizin ist die histologische Begutachtung von Gewebe. Andere mikroskopische Techniken, wie die Konfokal-Mikroskopie und die Zwei-Photonen-Mikroskopie, sind weniger verbreitet, besitzen aber aufgrund der hohen Auflösung das Potenzial für eine breite klinische Anwendung [Baak u. a., 1987; Johansson u. a., 2008]. Die klassischen Anwendungen der klinischen Konfokal-Mikroskopie sind in der Dermatologie und der Ophthalmologie aufgrund der direkten Zugänglichkeit zu finden. In der Dermatologie werden bereits Studien mit einem kommerziellen Zwei-Photonen-Mikroskop, DermaInspect (JenLab GmbH, Jena) durchgeführt [Dimitrow u. a., 2009]. Eine Übersicht der klinischen Anwendungen der Konfokal-Endomikroskopie und der Zwei-Photonen-Mikroskopie ist bei Johansson u. a., 2008 zu finden. Die technischen Herausforderungen für eine kommerzielle endoskopische Umsetzung der Zwei-Photonen-Mikroskopie sind derzeit noch nicht überwunden. Die aktuellen klinischen Anwendungen der Konfokal-Endomikroskopie bieten jedoch das Potenzial durch eine Einführung der Zwei-Photonen-Endomikroskopie erweitert und verbessert zu werden. Die klinischen Anwendungen der Konfokal-Endomikroskopie wachsen seit der Einführung zweier klinisch zugelassener konfokaler Endoskopiesysteme. Das erste klinisch zugelassene System wurde anfangs von der Firma Optiscan (Notting Hill, Victoria, Australia) entwickelt und später in Zusammenarbeit mit der Firma Pentax (Tokyo, Japan) zur Zulassung gebracht und vertrieben. Für die Endoskopiestation (ISC-1000) gibt es zwei Endoskope mit einer integrierten Konfokalsonde, eins für den oberen Bauchraum (EG-3870CIK) und das andere für die Koloskopie (EC-3870CILK). Das andere System, CellVizio®, wird von der Firma Mauna Kea Technologies (Paris, Frankreich) hergestellt und vertrieben. Es stehen für die Anwendungen im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, in der Gallengang und in der Harnblase eine Auswahl an Sonden (GastroFlex^{UHD}, ColoFlex^{UHD}, AlveoFlexTM, AQ FlexTM 19, CholangioFlexTM, UroFlex BTM) mit verschiedenen Bildtiefen und Auflösungen zur Verfügung. Die Sonden können in den Arbeitskanal eines normalen Endoskops integriert werden. Die erste Anwendung im menschlichen Körper wurde bereits im Jahr 2001 von Optiscan durchgeführt. Im Jahr 2005 folgte dann die klinische Zulassung des Systems von Pentax und Optiscan in den USA (FDA) und Europa (CE) für Anwendungen im Gastrointestinaltrakt. Das CellVizio®-System erlangte ebenfalls im Jahr 2005 eine klinische Zulassung in den USA (FDA) und Europa (CE) für den Gastrointestinaltrakt und die Lunge. Aktuell wurde das System noch für Anwendungen im Gallengang, in

der Harnblase sowie für weitere Märkte zugelassen. Auf die technischen Unterschiede wird im Kapitel 1.2 näher eingegangen. Aufgrund des kleineren Durchmessers der CellVizio®-Sonde ist das potenzielle Anwendungsgebiet größer. Prinzipiell besitzen jedoch beide Geräte eine sehr ähnliche Funktionalität und die folgenden Anwendungsgebiete gelten für beide Systeme und mögliche zukünftige weitere Instrumente dieser Art.

Durch die zelluläre Auflösung der Konfokal-Endomikroskopie können theoretisch alle Erkrankungen, die sich durch eine morphologische Veränderung auf Zellebene auszeichnen, erfasst werden. Die Schwierigkeit liegt derzeit noch darin, die spezifischen Veränderungen sichtbar zu machen, z.B. mit einer spezifischen Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Vor allem bei der Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen wird die Konfokal-Endomikroskopie erfolgreich eingesetzt. Eine Übersicht über bisher durchgeführte Studien, sowie deren Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit ist in Tabelle 1.1 dargestellt. Eines der ersten Anwendungsgebiete ist der Gastrointestinaltrakt (GI). Die erste Studie, die eine systematische Diagnose des kolorektalen Karzinoms beschreibt, ist von Kiesslich u. a. [2004] veröffentlicht. Für eine Unterscheidung von normalem Gewebe, regenerativem Gewebe und Neoplasien wurde die Analyse der Architektur der Gefäße und Krypten im Kolon etabliert (Mainzer Analyse). Diese Art der Analyse wird auch in späteren Studien verwendet. Damit konnten neoplastische Veränderungen mit einer Genauigkeit von 99.2% vorhergesagt werden. Weitere Anwendungen im Gastrointestinaltrakt sind: Barrett Ösophagus und assoziierte Neoplasien durch Barrett Ösophagus [Kiesslich u. a., 2006], Helicobacter pylori [Kiesslich u. a., 2005], chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [Liu u. a., 2011], wie Colitis ulcerosa [Kiesslich u. a., 2007] und kolorektales Karzinom [Kiesslich u. a., 2004]. Bei den meisten Studien konnte eine sehr gute Sensitivität und Spezifität festgestellt werden (siehe auch Tabelle 1.1). Es steigt aber nicht nur die Zahl der Publikationen, sondern auch die Zahl der Anwendungsgebiete. Für Anwendungen an der Lunge wurden mehrere Studien [Thiberville u. a., 2007; Thiberville u. a., 2009; Williamson u. a., 2009; Lane u. a., 2009; Salaun u. a., 2010] veröffentlicht, die sich mit der Darstellbarkeit verschiedener Läsionen, wie z.B. neoplastischer Veränderungen [Lane u. a., 2009] oder die Alveolarproteinose [Salaun u. a., 2010], beschäftigen. Erste Anwendungen im Gallengang [Meining u. a., 2008; Chennat u. a., 2011] zeigen ebenfalls gute Ergebnisse. Die Anwendungsgebiete können jedoch auf bisher nicht zugelassene Bereiche, wie die Cervix [Tan, Delaney und McLaren, 2007; Tan u. a., 2009], den Harntrakt [Sonn u. a., 2009a; Sonn u. a., 2009b; Wu u. a., 2011] oder die Mundschleimhaut [Zheng u. a., 2004; Thong u. a., 2007; Haxel u. a., 2010], ausgeweitet werden. In einer *Ex-vivo*-Studie [Sonn u. a., 2009a] an frischen Biopsien aus der Harnblase konnte durch eine topikale Applikation von Natrium-Fluorescein bzw. durch eine Instillation mit Natrium-Fluorescein Unterschiede in der Gewebearchitektur bei verschiedenen Läsionen festgestellt werden. Zwei spätere *In-vivo*-Studien [Sonn u. a., 2009b; Wu u. a., 2011] Studien im Harntrakt zeigen verschiedene Gewebeareale nach intravenöse und/oder intravesikaler Gabe von Natrium-Fluorescein. Es konnten eine Differenzierbarkeit der unterschiedlichen Gewebeareale und die abweichende Gewebestruktur von Läsionen dargestellt werden. Eine Färbung mit Acriflavin zeigt bei verschiedenen Stadien von Harnblasenkrebs eine unterschiedliche Zellkerndichte, die mit histologischen Befunden korrelieren [Wiesner u. a., 2011]. In diesen frühen Studien wurde aber noch kein Protokoll zur statistischen Auswertung angewendet.

Bei allen Anwendungen ist eine Herausforderung die begrenzte Anzahl an zugelassenen Fluoreszenzmarkern. Derzeit wird eine Färbung meistens durch intravenöse Gabe von klinisch zugelassenem Fluorescein realisiert. Damit können Gefäße und der Extrazellulärraum dargestellt werden. Für eine Analyse auf Zellebene ist aber eine selektive Anfärbung des Zellkerns oder des Cytoplasma wünschenswert. Der Zellkern kann durch eine topikale Applikation von Acriflavin [Kiesslich u. a., 2004; Tan u. a., 2009] oder Kresylviolett [George und Meining, 2003; Meining u. a., 2007; Goetz u. a., 2009] angefärbt werden. Für diese beiden Farbstoffe existiert allerdings keine klinische Zulassung. Eine zuverlässige und später auch automatisierte Auswertung erfordert jedoch eine klare Darstellung der relevanten zellulären Strukturen. Für manche Anwendungen, wie z.B. im Gallengang oder dem Harntrakt, müssen die relevanten auswertbaren Strukturen noch besser identifiziert werden. Vor allem bei einer nicht automatisierten Auswertung spielt dann auch der beurteilende Arzt eine wesentliche Rolle. So ist ein wichtiger Punkt, dass die Diagnose durch Training der untersuchenden Personen entscheidend verbessert werden kann. Die Genauigkeit der Diagnose von Barrett-Ösophagus und assoziierte Neoplasien durch Barrett Ösophagus verbesserte sich durch Training in einer Studie von Dunbar, Montgomery und Canto [2008] von 82% auf 90%. Bestätigt wird das in einer späteren detaillierten Studie bei kolorektalen Neoplasien. Dort verbesserte sich die Genauigkeit von 63% auf 86% [Buchner u. a., 2011].

Eine weitere Einschränkung der Konfokal-Endomikroskopie ist die limitierte Abbildungstiefe von erfahrungsgemäß maximal 100 µm. Das System von Pentax ermöglicht zwar eine Abbildungstiefe bis 250 µm aufgrund von Gewebestreuung ist das Signal aus diesen vergleichsweise tiefen Gewebebeschichten aber stark verrauscht. Diese Einschränkung soll durch den Einsatz der Zwei-Photonen-Endomikroskopie aufgehoben werden.

1.2 Stand der Technik der Zwei-Photonen-Endomikroskopie

Die Zwei-Photonen-Endomikroskopie basiert auf den Grundprinzipien der Zwei-Photonen-Mikroskopie, bei der die Systemkomponenten so miniaturisiert wurden, dass ein endoskopischer Einsatz möglich ist. Hochauflösende Mikroskopieverfahren stellen daher die Grundlage für die hochauflösende Endomikroskopie dar und sollen in den folgenden Abschnitten kurz erklärt werden.

1.2.1 Hochauflösende Mikroskopieverfahren

1.2.1.1 Konfokal-Mikroskopie

Das klassische Lichtmikroskop mit seiner beugungsbegrenzten Auflösung – laut der Theorie von Abbe – ist mittlerweile durch eine Vielzahl an neuen Mikroskopie-Techniken erweitert worden. Alle diese Techniken haben das Ziel die Auflösung zu verbessern. Eine der ersten Methoden dafür ist die Konfokal-Mikroskopie [Pawley, 2006]. Die konfokale Mikroskopie verbessert in erster Linie die axiale Auflösung. Ein konfokales Mikroskop kann daher als ein

Anwendung	Publikation	Sens.	Spez.	Genaugk.	Besonderheit
GI					
allgemein Neoplasien	[Meining u. a., 2007]	93.1%	92.1%	92.4%	Färb. mit Kresylviolett, CellVizio®, n=47
<i>Ösophagus</i>					
Barrett-Ösophagus	[Kiesslich u. a., 2006] [Badreddine u. a., 2008] [Pech u. a., 2008]	98.1% 94% 100%	94.1% 50% 87%	96.8% - 95%	Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=63 Färb. mit Fluorescein, CellVizio®, n=62 Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=21
Plattenepithelkarzinom					
<i>Gaster</i>					
Helicobacter pylori	[Ji u. a., 2010] [Wang u. a., 2010] [Zhang u. a., 2008] ,, ,,	89.2% 82.9% 90.0% 83.6% 81.8%	95.7% 90.9% 99.4% 99.6% 99.3%	92.8% - 97.1% 97.1% 95.8%	Färb. mit Acriflavin, Pentax, n=83 Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=118 Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=132 ,, ,,
Neoplasien					
Atrophie					
Gastritis					
<i>Kolon</i>					
kolorektale Neoplasien	[Kiesslich u. a., 2004] [Hurlstone u. a., 2008]	97.4% 97.4%	99.4% 99.3%	99.2% 99.1%	Färb. mit Fluorescein und Acriflavin, Pentax, n=42, Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=40, in
	[De Palma u. a., 2010]	100%	84.6%	92.3%	Kombination mit Chromoendoskopie
	[Buchner u. a., 2010] [Kiesslich u. a., 2007]	91% 91%	76% 98.3%	- % 97.8%	Färb. mit Fluorescein, CellVizio®, n=20, in
Polypen					Kombination mit Video Mosaicing
Colitis ulcerosa					Färb. mit Fluorescein, CellVizio®, n=75
					Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=80, in
					Kombination mit Chromoendoskopie
					Färb. mit Fluorescein, Pentax, n=36
Unterscheidung DALM* und ALM**	[Hurlstone u. a., 2007] [Leong u. a., 2008] [Venkatesh u. a., 2010] [Günther u. a., 2010]	100% 94.1% 100% 74%	96.6% 92.3% 80% - %	97% 94.6% - % - %	Färb. mit Fluorescein und Acriflavin, Pentax, n=31 Färb. mit Fluorescein und Acriflavin, Pentax, n=18 Färb. mit Fluorescein und Acriflavin, Pentax, n=30 Färb. mit Fluorescein und Acriflavin, Pentax, n=30
Zöliakie					,, ,, ,, ,,
Zottenatrophie					
erhöhte Zahl an IELs***					
Kryptenhyperplasie					
<i>Cervix</i>					
CIN****	[Tan u. a., 2009] ,, ,,	97%	80 % 93 %	86%	Färb. mit Acriflavin, Optiscan F900e, n=25 ,, ,,
CIN1					
CIN2 und CIN3					
<i>Cholangiokarzinom</i>	[Meining u. a., 2008]	83%	88%	86%	Färb. mit Fluorescein, CellVizio®, n=14

Tabelle 1.1 Übersicht über verschiedene Studien zur Anwendung der Endomikroskopie; *DALM = "dysplasia associated lesion or mass", ** ALM = "adenoma-like mass", ***IELs = intraepithelialen Lymphozyten, ****CIN = Zervikale intraepitheliale Neoplasie

Instrument mit extrem geringer Schärfentiefe angesehen werden, das aber eine wesentlich bessere Streulichtunterdrückung als das klassische Mikroskop besitzt. Das Licht einer Lichtquelle wird auf eine Blende (Pinhole) fokussiert, über einen Strahlteiler reflektiert und von einem Mikroskopobjektiv in eine Ebene fokussiert. Das zurückgestrahlte Licht wird vom Objektiv gesammelt und über den Strahlteiler auf eine zweite Blende fokussiert, hinter der ein Detektor steht (siehe Abbildung 1.1 (a)). Die Fokussierung des Lichtes auf

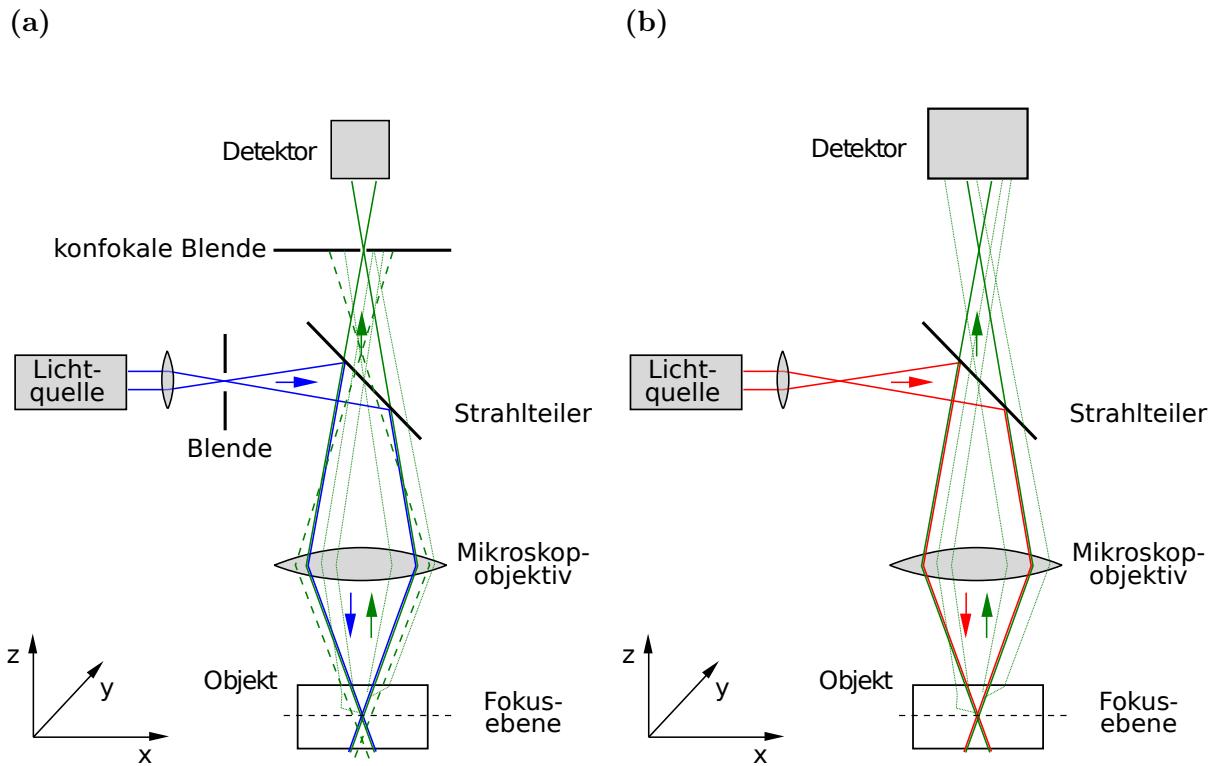


Abbildung 1.1 Prinzipieller Aufbau eines (a) Konfokal- und (b) Zwei-Photonen-Mikroskops

die zweite Blende erzeugt dort eine zu der im Objekt konjugierten Fokusebene. Die dadurch erzeugte Konfokalität ermöglicht es, nur das Licht aus einer Fokusebene mit dem hinter der Blende liegenden Detektor aufzusammeln. Über einen Scanner kann die Probe abgerastert werden und die so abgescannten Punkte mit einem Computer dargestellt werden. Als Lichtquelle wird meistens ein Laser verwendet, um die benötigte hohe Lichtintensität an der Probe zu erreichen. Da ein Laser eine Punktlichtquelle ist, kann auf die erste Blende im Strahlengang verzichtet werden. Zur Erzeugung einer konjugierten Fokusebene im scannenden Fall ist es in der Konfokal-Mikroskopie notwendig, das zurückgestrahlte Licht wieder über den Scanner gehen zu lassen um den Lichtweg umzukehren. Aufgrund dieser Position wird der Detektor auch als „descanned“ Detektor bezeichnet. Bei der Konfokal-Mikroskopie wird bei biologischen Proben meistens mit Fluoreszenz gearbeitet. Durch einen dichroitischen Strahlteiler erfolgt eine spektrale Trennung zwischen dem

eingestrahlten Licht und dem Fluoreszenzlicht, das durch den Stokes-Shift zu längeren Wellenlängen hin verschobenen ist.

1.2.1.2 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Eine andere Möglichkeit, die axiale Auflösung zu verbessern, bietet die Zwei-Photonen-Mikroskopie [Denk, Strickler und Webb, 1990; Tsai u. a., 2009; Zipfel, Williams und Webb, 2003; Helmchen und Denk, 2005]. Statt ein Elektron mit einem

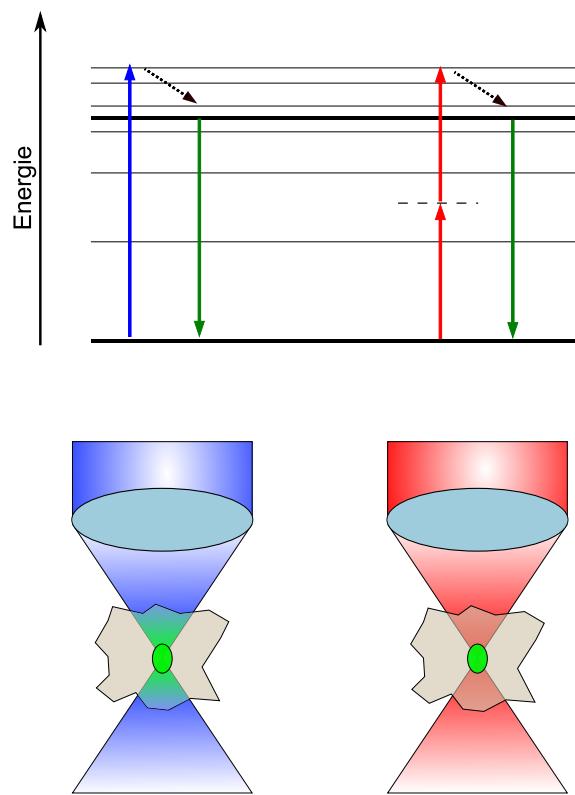


Abbildung 1.2 Vergleich der Einphotonen- und Zwei-Photonen-Anregung

Photon anzuregen, wird nun das Elektron mit zwei Photonen doppelter Wellenlänge über einen sehr kurzlebigen virtuellen Zustand ($\sim 10^{-16}$) angeregt (siehe Abbildung 1.2). Die Wahrscheinlichkeit einer Zwei-Photonen-Absorption skaliert quadratisch mit der Intensität des einfallenden Laserlichts und ist im Vergleich zur Ein-Photonen-Absorption wesentlich kleiner. Durch die Fokussierung des einfallenden Laserlichts wird die bestrahlte Fläche bis auf einen Submikrometerbereich im Fokus reduziert. Nur im Fokus ist die Intensität ausreichend hoch, um Fluoreszenz anzuregen. Zusätzlich werden überwiegend gepulste Laserquellen mit einer Pulsdauer im Femtosekundenbereich verwendet. Die Photonendichte ist dabei kurzzeitig sehr hoch. Durch die transient hohe Zahl der Photonen kann die Anzahl der Zwei-Photonen-Absorptionen erhöht werden ohne eine zu große mittlere Leistung zu benötigen und damit thermische Schäden im Gewebe zu erzeugen. Die Intensität der Fluoreszenz, $I_{\text{Fluoreszenz}}$, ist quadratisch abhängig von der

mittleren Leistung des Lasers, P_{Anregung} , hingegen linear abhängig von der Pulsdauer τ und der Laserrepetitionsrate f :

$$I_{\text{Floureszenz}} \sim \frac{P_{\text{Anregung}}^2}{\tau f}$$

Aus der selektiven Anregung im Fokus gehen unmittelbar die wesentlichen Vorteile der Zwei-Photonen-Mikroskopie hervor. Im Vergleich zur Konfokal-Mikroskopie kann hier auf eine Blende vor dem Detektor verzichtet werden und somit das gesamte Fluoreszenzlicht aufgesammelt werden. Besonders in streuenden Medien ist dies von Vorteil (Vergleiche Abbildung 1.1). Ein weiterer Vorteil ist, dass nur im Anregungsfokus die Fluoreszenz ausgeblendet wird. Durch die Verdopplung der Wellenlänge kann für typische Fluorophore die Eindringtiefe des Lichts in Gewebe auf Grund der niedrigeren Absorption und Streuung im Vergleich zur Konfokal-Mikroskopie vergrößert werden. Da in der Zwei-Photonen-Mikroskopie keine konjugierte Fokusebene mit einer Blende benötigt wird, gibt es keine Einschränkungen für die Position des Detektors, der somit möglichst nah an der Probe aufgestellt werden kann („non-descanned“). Dadurch wird verhindert, dass Fluoreszenzlicht durch Verluste an Spiegel oder Linsen verloren geht. Durch diese Vorteile ermöglicht die Zwei-Photonen-Mikroskopie funktionelle Bildgebung mit hoher lateraler und axialer Auflösung selbst in stark streuendem Gewebe wie Hirngewebe *in vivo* bis zu Tiefen von 1 mm [Theer, Hasan und Denk, 2003].

1.2.2 Hochauflösende Endomikroskopie-Verfahren

Die technische Herausforderung, sowohl die Konfokal-Mikroskopie als auch die Zwei-Photonen-Mikroskopie endoskopisch umzusetzen, liegt in der Miniaturisierung der einzelnen Systemkomponenten. Eine gute Übersicht über verschiedenen Ansätze ist bei Helmchen, 2002, Delaney und Harris, 2006 und Fu und Gu, 2007 zu finden. In dieser Arbeit werden Ansätze, die einen tragbaren miniaturisierten Scankopf verfolgen [Flusberg u. a., 2005] nicht ausführlich beschrieben, da sich diese zwar für die Beobachtung in sich frei bewegenden Tieren sehr gut eignen, aber für eine endoskopische Umsetzung nur bedingt tauglich sind.

a) Glasfasern

Um den Lichtweg zwischen Laser und zu untersuchender Probe zu verlängern bietet sich die Verwendung von flexiblen Glasfasern an. Die Fokussierbarkeit von Laserlicht ist bestimmt

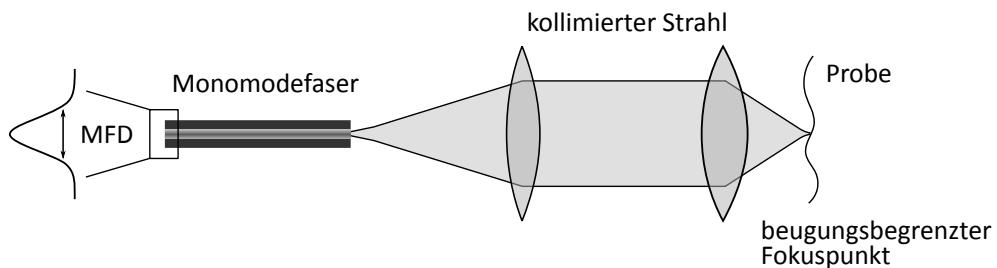


Abbildung 1.3 Fokussierung nach einer Monomodefaser (nach Helmchen, 2002). MFD ist der Modenfelddurchmesser innerhalb einer Monomodefaser.

durch das Profil des Lasers. Im Falle von Monomodefasern entsteht durch den alleinigen Transport der Grundmode ein gaußförmiges Profil das beugungsbegrenzt fokussierbar ist (siehe Abbildung 1.3). Der Nachteil solcher Monomodefasern ist die relativ geringe numerische Apertur und der kleinen Modenfelddurchmesser (MFD). Der MFD gibt die Breite des nahezu gaußförmigen Intensitätsprofils in der Faser bei $1/e^2$ an. Durch den kleinen MDF entstehen zum einen Verluste beim Einkoppeln des Anregungslichtes, zum anderen bei der Kollektion des Fluoreszenzlichts. Mit photonischen Kristallfasern, „photonic crystal fibers“ (PCF), kann durch eine spezielle Mikrostrukturierung die Einschränkungen von klassischen Glasfasern überwunden werden, da die Lichtleitung nicht durch einen Brechungsindexsprung zwischen zwei Materialien begrenzt wird [Russell, 2003]. Durch die Mikrostrukturierung mit Luftlöchern kann der Modenfelddurchmesser vergrößert werden („large-mode-area“ LMA PCF [Knight u. a., 1998]) oder im Falle von photonic-bandgap Fasern ein Lichttransport in Luft erreicht werden („hollow core“ PCF). Der Nachteil dieser Fasern ist eine ebenfalls kleine numerische Apertur und, dass vor allem bei „hollow core“ PCFs nur in einem relativ schmalbandigen Wellenlängenbereich ein Lichttransport möglich ist und das Fluoreszenzlicht somit nicht mehr effizient detektiert werden kann. Durch einen zweiten Mantel kann bei den LMA PCFs beim Rücktransport des Fluoreszenzlicht die numerische Apertur vergrößert werden („double-clad“ PCF [*Double-clad Fibers in Encyclopedia of Laser Physics and Technology*]). Auch bei normalen Monomodefasern kann durch einen zweiten Mantel die Effizienz der Fluoreszenzkollektion gesteigert werden. Die meisten PCFs und Monomodefasern mit einem zweiten Mantel sind für den nahinfraroten oder infraroten spektral Bereich ausgelegt und kommen daher vor allem in der Zwei-Photonen-Endomikroskopie zum Einsatz. Darauf wird später nochmals in diesem Kapitel eingegangen. PCFs können aber auch für Konfokal-Endomikroskopie von Vorteil sein [Lemire-Renaud u. a., 2011]. Eine Übersicht der unterschiedlichen Fasern ist in Abbildung 1.4 zu sehen. Alternativ zu einer einzelnen Glasfaser kann

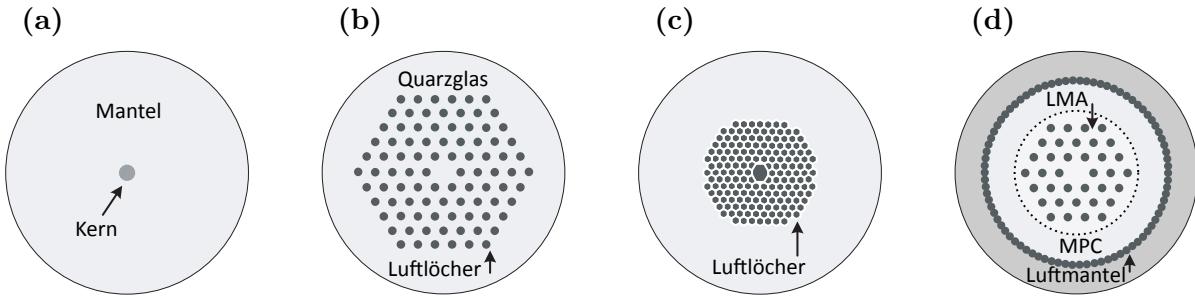


Abbildung 1.4 (a) Monomodefaser: besteht aus einem Mantel („cladding“) und einem Kern. Durch den Brechungsindexsprung wird das Licht im Kern geleitet. (b) LMA PCF („large-mode-area photonic crystal fiber“): Durch die Mikrostrukturierung mit Luftlöchern kann der Lichttransport bei der Grundmode mit vergrößertem Durchmesser gewährleistet werden. (c) photonic-bandgap PCF: Durch die Mikrostrukturierung kann im inneren der Faser der Lichttransport in Luft erreicht werden. (d) „double clad“ PCF: eine LMA PCF ist mit einem zusätzlichen Luftmantel umgeben. In dem Raum zwischen LMA und dem Luftmantel entsteht ein zweiter Mantel, in dem multimode Licht gepumpt werden kann, „multimode pump cladding“ (MPC). (a)-(c) nach Fu und Gu, 2007, (d) nach *Double-clad Fibers in Encyclopedia of Laser Physics and Technology*

auch ein Glasfaserbündel verwendet werden. Diese Faserbündel können aus bis zu 50 000 einzelnen Fasern bestehen. Der Kerndurchmesser einer einzelnen Faser, das Fasermaterial und die numerische Apertur des Faserbündels bestimmen den Transport des Anregungslichtes, inwieweit ein monomode Transport möglich ist. Es gibt verschiedene Arten von Faserbündeln, die hauptsächlich in der klassischen Endoskopie verwendet werden. Zum einen gibt es Faserbündel mit geordneten Fasern, die zur Bildübertragung genutzt werden. Es gibt aber auch Faserbündel, die eine ungeordnete Zuordnung der einzelnen Fasern besitzen und für die Beleuchtung in der Endoskopie eingesetzt werden. Für die Endomikroskopie wurden bisher Bildleiterbündel eingesetzt.

b) Distale Optik

Ein weiterer Teil der miniaturisiert werden muss, ist die distale Optik zur Fokussierung des Anregungslichtes in der Probe. Dabei gibt es verschiedene Arten von Mikrooptiken: Objektive auf Basis von miniaturisierten Linsen und GRIN-Linsen. GRIN-(GRadient INdex)-Linsen sind Zylinderlinsen, die durch eingebrachte Fremdatome einen radialen Brechungsindexgradienten besitzen [Messerschmidt, McIntyre und HoudeWalter, 1996]. In allen Mikrooptiken wird im ersten Schritt das Licht aus der Faser kollimiert und in einem zweiten Schritt auf oder in die Probe fokussiert. Der erste Teil der Optik sollte möglichst gut an die numerische Apertur der Glasfaser angepasst sein. Beim zweiten Teil ist die Herausforderung eine möglichst große numerische Apertur zu erreichen, um eine möglichst effiziente Anregung und Detektion des Fluoreszenzlichtes, sowie eine gute laterale und axiale Auflösung zu gewährleisten. Mit speziellen GRIN-Linsen in Kombination mit einer miniaturisierten Plankonvexlinse aus starkbrechendem LaSFN9 kann derzeit eine numerische Apertur von 0.85 erreicht werden [Barretto, Messerschmidt und Schnitzer, 2009].

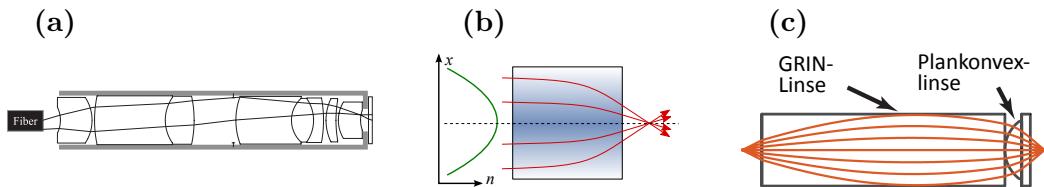


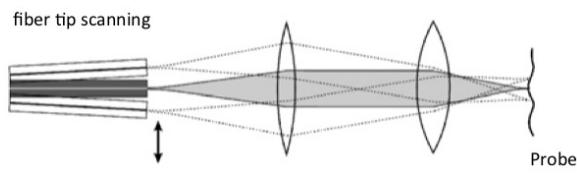
Abbildung 1.5 (a) Schematische Zeichnung einer Mikrooptik mit 3 mm großen Linsen nach Rouse u. a., 2004. (a) Prinzip einer GRIN-Linse mit einer parabolischen Änderung des Brechungsindex n entlang der radialen Achse x [Wikipedia!]. (c) hochauflösende GRIN-Objektiv mit einer zusätzlichen Plankonvexlinse. Nach Barretto, Messerschmidt und Schnitzer, 2009. Auf der rechten Seite schließt das Gewebe an

c) Rastermechanismus / Scanning

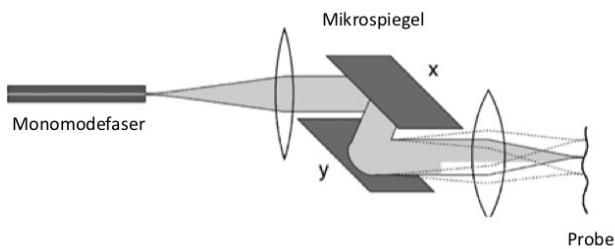
Für das Abrastern der Probe gibt es im wesentlichen zwei Ansätze, zum einen die Verwendung von miniaturisierten Scannern und einem distalen Abrastern der Probe (Abbildung 1.6 (a) und (b)) und zum anderen die Verwendung von Faserbündeln und einer Scanneinheit, die proximal die einzelnen Faserkerne abrastert (Abbildung 1.6 (c)). Bei der Version mit einer einzelnen Faser und einer miniaturisierten Scannereinheit sind im wesentlichen zwei verschiedene Ausführungen beschrieben, entweder wird das Faserende in Vibration gebracht („fiber tip scanning“) (Abbildung 1.6 (a)), oder Mikrospiegel als

Scanner eingesetzt, z.B.: optische „micro-electro-mechanical systems“ (MEMS) Spiegel (Abbildung 1.6 (b)). Als erstes wurde von Delaney, Harris und King, 1993 die konfokale

(a)



(b)



(c)

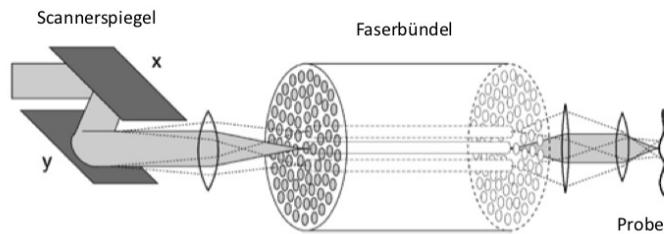


Abbildung 1.6 Scannermechanismen in Endomikroskopie: (a) fiber tip scanning: verschiedene Methoden bringen das Faserende in Vibration (b) Mikrospiegel: im kollimierten Strahlengang werden Mikrospiegel eingebbracht (c) Faserbündel: die einzelnen Fasern eines kohärenten Faserbündels werden über einen Scanner abgerastert. Nach Helmchen, 2002

Verwendung einer Monomodefaser und einem „fiber tip scanning“ System beschrieben. Damit konnten Blutgefäße *in vivo* dargestellt werden. Dieses System bildet die Grundlage für die Entwicklung des klinischen konfokalen Endomikroskops von Pentax. Alternativ dazu kann die distale Optik mit der Faser verbunden werden und zusammen in Vibration gebracht werden [Giniunas, Juskaitis und Shatalin, 1993]. Der Ansatz, Mikrospiegel zu verwenden, wurde von Dickensheets und Kino, 1996 beschrieben und ist in der Literatur als Alternative zum „fiber tip scanning“ wesentlich öfter zu finden, als die Faser mit der distalen Optik zu verbinden. Das „fiber tip scanning“ wurde als erstes für die Zwei-Photonen-Anregung von Helmchen u. a., 2001 nutzbar gemacht. Dabei wurde eine Monomodefaser zur Anregung verwendet. Zur Detektion wurde in den miniaturisierten Scannerkopf direkt an der Probe ein Photomultiplier eingebaut. Das Faserende wurde mit Hilfe eines Piezoelements in resonante Schwingungen in x- und y-Richtung versetzt und ein Scanmuster in Form von Lissajous Figuren erzeugt. Damit konnten Kalziumsignale *in*

vivo am Mäusegehirn gemessen werden. Das Faserende kann aber auch in Spiralbewegung oder nichtresonante Sinusschwingungen versetzt werden. Bei dem „fiber tip scanning“ entstehen meist Verzerrungen des Scanraster, die nur durch eine Bildbearbeitung zu einer einheitlichen Rastergröße führen. Bei resonanten Schwingungen besteht stets die Problematik, dass durch unterschiedliche Geschwindigkeit der Scanbewegung am Bildrand im Vergleich zur Bildmitte die Verweildauer des scannenden Laserstrahls auf der Probe unterschiedlich lang ist und es zu einer inhomogenen Ausleuchtung der Probe kommt. Mit diesem Ansatz konnte eine mittlere Pixelverweildauer von 300 µs/Pixel [Rivera u. a., 2011] bis zu 2,4 µs/Pixel [Engelbrecht u. a., 2008] erreicht werden. Solche Faserscannersysteme können laut Literatur derzeit mit einem Durchmesser von 1 mm realisiert werden Engelbrecht u. a. [2008]. Damit wurden Außendurchmesser von 2,4 mm [Myaing, MacDonald und Li, 2006] bis 3 mm [Le Harzic u. a., 2008] erreicht. Das klinisch zugelassene konfokale System von Pentax ist mit 5 mm etwas größer und daher bereits in einem Endoskop eingebaut. Damit ist das System auf Anwendungen im GI-Trakt beschränkt und erreicht eine Bildwiederholrate von ca. 1 Hz mit einer Pixelverweildauer von 1,1 µs/Pixel. Die alternative Methode ein Faserbündel anstelle einer Einzelfaser zu verwenden, wurde zum ersten Mal in einer konfokalen Version von Gmitro und Aziz, 1993 beschrieben. In diesem Ansatz wurde als distale Optik keine Mikrooptik, sondern zwei Mikroskopobjektive verwendet. Die Kombination mit Mikrooptiken [Sabharwal u. a., 1999; Rouse u. a., 2004] bzw. Grinlinsen [Knittel u. a., 2001] folgte wenig später. Das klinisch zugelassenen CellVizio® von Mauna Kea Technologies verwendet ebenfalls Faserbündel. Der Einsatz von Faserbündel in der Zwei-Photonen-Endomikroskopie [Göbel u. a., 2004; Lelek u. a., 2007; Thomsen u. a., 2010] wird in der Literatur vergleichsweise selten beschrieben. Der erreichte Außendurchmesser beträgt 1 mm [Göbel u. a., 2004]. Konfokal ist es laut Mauna Kea Technologies möglich, einen Außendurchmesser von 0,3 mm bis maximal 4,2 mm, zu erreichen (<http://www.maunakeatech.com>) bei einer Bildwiederholrate von 12 Hz mit einer Pixelverweildauer von ca. 0,28 µs/Pixel. Die verschiedenen Scannermechanismen trennen letztendlich die Ansätze zur Realisierung eines Endomikroskop in zwei Gruppen auf, zum einen in einen Ansatz basierend auf einer Einzelfaser und zum anderen in einen Ansatz basierend auf einem Faserbündel.

Besonderheiten der Zwei-Photonen-Endoskopie

Durch den Einsatz von flexiblen Glasfasern treten bei der Zwei-Photonen-Endomikroskopie zu der technischen Herausforderung der Miniaturisierung noch Probleme bei dem Transport der ultrakurzen Pulse in den Glasfasern auf. Durch die spektrale Breite der ultrakurzen Pulse wird aufgrund der Dispersion die Pulsdauer am Faserausgang verlängert. Zusätzlich treten bei den hohen Leistungsdichten innerhalb des Faserkerns noch nichtlineare Wechselwirkungen auf, die als Folge die Pulsdauer weiter verbreitern. Auf diese Effekte wird in den folgenden Kapiteln (siehe) noch weiter eingegangen. Durch die Verbreiterung der Pulsdauer wird allerdings auch die Wahrscheinlichkeit der Zwei-Photonen-Anregung verringert. Während die Dispersionseffekte (lineare Effekte) durch einen Kompressor am proximalen Ende der Faser weitgehend kompensiert werden können, gibt es keine direkte Möglichkeit die nichtlinearen Effekte zu kompensieren. Zwar existieren Konzepte zur einer spektralen Pulsförderung, die eine Erhaltung der ursprünglichen Pulsdauer am Faserausgang ermöglicht [Clark, Ilday und Wise, 2001; Lelek

u. a., 2007], deren Nachteil ist aber neben einem komplexen Aufbau ein einhergehender hoher absoluter Leistungsverlust, welcher den Effekt der Pulskompression wieder zunichte macht.

Beide Ansätze, Einzelfaser und Faserbündel, haben für die Anwendung in der Konfokal-Endomikroskopie und Zwei-Photonen-Endomikroskopie verschiedene Vor- und Nachteile. Bei einem Einzelfaseransatz ist der wesentliche Vorteil für die Zwei-Photonen-Endomikroskopie, dass durch die Verwendung der beschriebenen PCF der Modenfelddurchmesser vergrößert werden kann und somit die Leistungsdichte innerhalb des Faserkerns reduziert werden kann. Nichtlineare Wechselwirkungen im Faserkern der ultrakurzen Pulse können somit reduziert werden. Im Vergleich dazu sind die nichtlinearen Wechselwirkungen in Faserbündeln wesentlich höher, da diese teilweise sogar einen kleineren Faserkern besitzen als Monomodefasern. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Faserbündeln ist die schlechtere laterale Auflösung, da diese letztendlich über die Anzahl der Bildelemente bzw. den Abstand der Faserkerne limitiert ist. Bei einem Einzelfaseransatz ist die laterale Auflösung beugungslimitiert und damit nur von der Optik abhängig. Für einen erfolgreichen klinischen Einsatz sowohl der Konfokal-Endomikroskopie als auch der Zwei-Photonen-Endomikroskopie ist ein weiteres Kriterium der Außendurchmesser der Fasersonde. Obwohl der Außendurchmesser bei einem Einzelfaseransatz verkleinert werden konnte, ist der Außendurchmesser bei einem Faserbündelansatz ohne technischen Aufwand tendenziell kleiner realisierbar. Ein weiteres Kriterium ist die Bildwiederholrate bzw. die erreichte Pixelverweildauer, da die Bildgebung vor allem bei Bewegung und damit bei allen Anwendungen *in vivo* durch eine hohe Bildwiederholrate erleichtert wird. Die Miniaturisierung einer schnellen distalen Scannereinheit ist technisch aufwendiger als der Einsatz von Faserbündeln mit einer externen Scannereinheit. Aufgrund der genannten Vorteile wird in dieser Arbeit der Ansatz basierend auf Faserbündeln weiterverfolgt und die Realisierbarkeit getestet.

1.3 Ultrakurzzeitoptik

In der Zwei-Photonen-Mikroskopie und Endoskopie werden ultrakurze Laserpulse verwendet, um kurzfristig eine hohe Photonendichte zu erreichen und damit die Wahrscheinlichkeit der Zwei-Photonen-Absorptionsprozesse zu erhöhen. Das Wort ultrakurz bezeichnet eine Dauer im Bereich von Femtosekunden und noch kürzer der optischen Pulse. Eine Vorstellung über die Dauer einer Femtosekunde erhält man, indem man sich das Verhältnis von einer Sekunde zu einer Femtosekunde in einen größeren Maßstab setzt: das Verhältnis von einer Femtosekunde zu einer Sekunde entspricht dann fünf Minuten im Verhältnis zum Alter der Erde. Die Physik dieser optischen Pulse und die Interaktion mit Materie sollen im Folgenden erläutert werden. Dafür ist es notwendig, einige Begriffe aus der Ultrakurzzeitoptik und deren mathematische Beschreibung zu erklären. Die Grundlage für die Unterkapitel bilden im Wesentlichen die Bücher von Diels und Rudolph [2006] und von Saleh und Teich [2008].

1.3.1 Das Wellenpaket

Die mathematische Beschreibung der Pulse erfolgt durch elektromagnetische Wellen in Form von Wellenpaketen. Ein Wellenpaket besteht aus vielen überlagerten Schwingungen, die sich an einem begrenzten Ort zu einer Amplitude aufaddieren. Die äußere Form, die Amplitude, des Wellenpakete lässt sich durch seine Einhüllende beschreiben. Bei der Ausbreitung der Wellenpakete gibt es eine Phasen- und eine Gruppengeschwindigkeit. Die Gruppengeschwindigkeit v_g ist die Geschwindigkeit, mit der sich die Amplitude fortpflanzt. Die Phasengeschwindigkeit v_{ph} ist die Geschwindigkeit, mit der sich die Trägerwelle (carrier wave) fortpflanzt. Ein Wellenpaket kann nicht nur über seine Dauer in der Zeitdomäne beschrieben werden, sondern auch über die Frequenzen aus denen sich das Wellenpaket zusammensetzt, in der Frequenzdomäne. Beide Darstellungen sind äquivalent und können durch eine Fourier-Transformation ineinander überführt werden. Als Konsequenz ergibt sich, dass ein Wellenpaket mit einer zeitlichen Dauer ebenfalls eine spektrale Breite besitzt. Das Produkt der spektralen Breite mit der zeitlichen Dauer besitzt einen minimalen Wert der nicht unterschritten werden kann (Zeit-Bandbreite-Produkt = time-bandwidth product **TWP**), d.h. je kürzer das Wellenpaket ist desto spektral breiter ist das Wellenpaket. Bei optischen Pulsen, die ein transparentes Medium passieren, erfährt das Wellenpaket Dispersion, da die einzelnen Frequenzen des Wellenpakets unterschiedlich verzögert werden. Das Wellenpaket wird dadurch zeitlich breiter. Außer Wellenpaketen aus Licht gibt es auch andere Wellenpakete, z.B. aus Materie, was in der Quantenmechanik eine wichtige Rolle spielt. Im Folgenden sollen jedoch ultrakurze optische Pulse beschrieben werden.

1.3.2 Das komplexe elektrische Feld

Die zeitlichen und spektralen Eigenschaften von ultrakurzen Pulsen sollen zunächst an einem festen Ort \mathbf{r} beobachtet werden. Die Abhängigkeit des elektrischen Felds $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = E(t)$ vom Ort \mathbf{r} kann daher vernachlässigt werden. Das elektrische Feld $E(t)$ ist prinzipiell eine Messgröße und daher eine reelle Größe. Viele Berechnungen sind allerdings im Frequenzraum leichter zu bewerkstelligen. Mit Hilfe einer Fourier-Transformation kann das reelle elektrische Feld in den Frequenzraum überführt werden.

$$\tilde{E}(\Omega) = \mathcal{F}\{E(t)\} = \int_{-\infty}^{\infty} E(t) e^{-i\Omega t} dt = |\tilde{E}(\Omega)| e^{i\psi(\Omega)} \quad (1.1)$$

$|\tilde{E}(\Omega)|$ ist die spektrale Amplitude und $\psi(\Omega)$ die spektrale Phase. Durch die Fourier-Transformation wird das elektrische Feld im spektralen Raum komplex (Komplexe Größen werden im Folgenden mit einer \sim gekennzeichnet). Da das elektrische Feld $E(t)$ reell ist und damit auf das komplex konjugierte elektrische Feld abgebildet wird, $E(t) = E^*(t)$, ist das komplex konjugierte spektrale elektrische Feld $\tilde{E}(\Omega)$ eine Spiegelung an der reellen Achse: $\tilde{E}(\Omega) = \tilde{E}^*(-\Omega)$. Da allerdings negative Frequenzen und damit negative Wellenlängen keine Messgröße sind, wird für die Darstellung des elektrischen Feldes in der Zeitdomäne ebenfalls eine komplexe Darstellung $\tilde{E}^+(t)$ gewählt, ein komplexes analytisches Signal des reellen elektrischen Feldes $E(t)$. Die Fourier-Transformierte $\tilde{E}^+(\Omega)$ ist dann nur für positive Frequenzen definiert. Ein optischer Puls ist um eine Wellenlänge

zentriert und besitzt eine gewisse spektrale Breite. Für die meisten Anwendungen gilt, dass die Bandbreite des Pulses $\Delta\omega$ ein kleiner Bruchteil der Trägerfrequenz ω_0 ist, $\Delta\omega/\omega_0 \ll 1$. Dann ändert sich die komplexe Einhüllende nur langsam mit der Zeit. Für die Pulsausbreitung ist dieses Konzept sehr hilfreich, da damit die theoretischen Berechnungen durch eine Näherung (slowly varying envelope approximation = **SVEA**) stark vereinfacht werden können. Die komplexe Wellenfunktion eines optischen Pulses, dessen spektrale Amplitude um eine Trägerfrequenz ω_0 zentriert ist, lautet damit:

$$\tilde{E}^+(t) = \frac{1}{2}\mathcal{E}(t)e^{i\varphi(t)}e^{i\omega_0 t} = \frac{1}{2}\tilde{\mathcal{E}}(t)e^{i\omega_0 t} \quad (1.2)$$

$\tilde{\mathcal{E}}(t)$ ist die komplexe Einhüllende und wird durch den Betrag ihre reellen Einhüllenden $\mathcal{E}(t)$ und ihrer zeitabhängigen Phase $\varphi(t)$ beschrieben. In Abbildung 1.7 ist ein Wellenpaket mit seiner Einhüllenden Amplitude und dem elektrischen Feld gezeigt.

1.3.2.1 Instantane Frequenz und gechirpte Pulse

In Gleichung 1.2 wurde die zeitabhängige Phase $\varphi(t)$ und eine zentrale Trägerfrequenz ω_0 eingeführt. Zusammen wird damit die Phase des komplexen elektrischen Feldes $\tilde{E}(t)$ beschrieben:

$$e^{i\Gamma(t)} = e^{i\varphi(t)}e^{i\omega_0 t} \quad (1.3)$$

Über die erste Ableitung des Phasenfaktors $\Gamma(t)$ wird damit eine zeitabhängige Trägerfrequenz $\omega(t)$ oder auch instantane Frequenz definiert:

$$\omega(t) = \omega_0 + \frac{d}{dt}\varphi(t) \quad (1.4)$$

Die instantane Frequenz gibt damit an, ob und wie ein Puls eine Frequenzmodulation bzw. einen Chirp besitzt. Wenn $d\varphi/dt = b = \text{const.}$ ändert sich die zentrale Trägerfrequenz ω_0 nur um einen konstanten Faktor. Wenn $d\varphi/dt = f(t)$ ändert sich die Trägerfrequenz mit der Zeit und der Puls ist damit gechirpt. Wenn $d^2\varphi/dt^2 > 0$ nimmt die Trägerfrequenz innerhalb des Pulses zu. Der Puls besitzt einen positiven Chirp oder ist positiv gechirpt. Wenn $d^2\varphi/dt^2 < 0$ nimmt die Trägerfrequenz innerhalb des Pulses ab. Der Puls besitzt einen negativen Chirp. Die einfachste Form eines Chirps ist eine lineare Änderung der instantanen Frequenz $\omega(t)$, d.h. die Phase ist eine quadratische Funktion und damit $d^2\varphi/dt^2$ (kurz φ'') eine Konstante, der Puls ist linear gechirpt (siehe Abbildung 1.7).

1.3.2.2 Messgrößen der optischen Pulse

Die bisher beschriebenen Eigenschaften der optischen Pulse bilden die theoretische Grundlage, allerdings gibt es für diese Größen keinen direkten Weg, sie experimentell zu messen. Die experimentellen Messgrößen sind z.B. die Leistung, die spektrale Intensität, die Pulsdauer oder die spektrale Breite. Im Folgenden sollen daher kurz die wichtigsten Begriffe definiert werden.

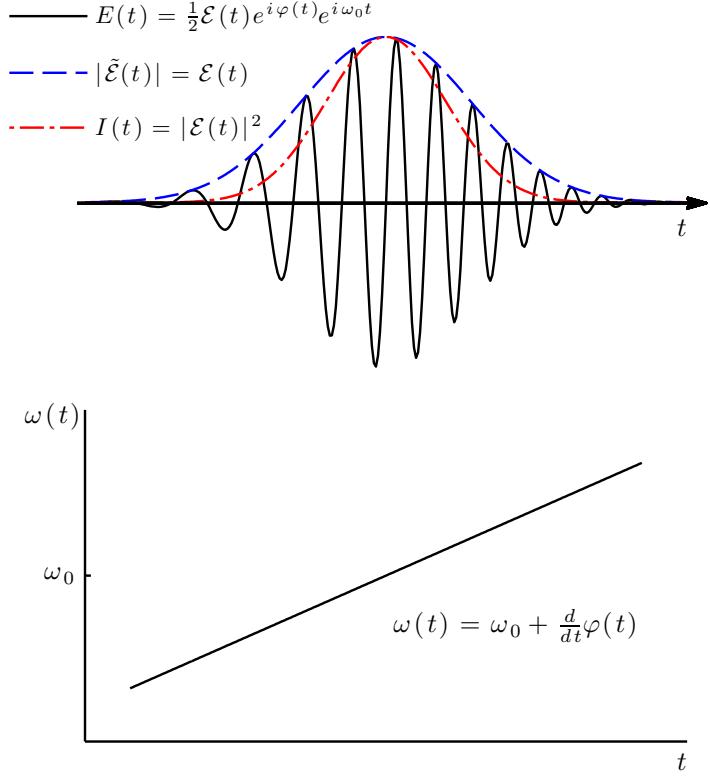


Abbildung 1.7 Instantane Frequenz. Nach Diels und Rudolph [2006].

Leistung, Intensität und spektrale Intensität

Angenommen ein Puls propagiert mit einem Strahlprofil des Querschnitts A in einem dispersionslosen Material des Brechungsexponenten n , dann lässt sich die instantane Leistung (in Watt) des Pulses mit einem elektrischen Feld $E(t)$ aus dem Poynting-Theorem der Elektrodynamik ableiten:

$$\mathcal{P}(t) = \varepsilon_0 c n \int_A dS \frac{1}{T} \int_{t-T/2}^{t+T/2} E^2(t') dt' \quad (1.5)$$

Dabei ist c die Lichtgeschwindigkeit, ε_0 die elektrische Feldkonstante und $\int_A dS$ ist die Integration über den Querschnitt des Strahlprofils. Die Leistung kann mit einem Detektor (Photodiode, Photomultiplier, etc.), der über den Querschnitt des Strahlprofils integriert, gemessen werden. Die Anstiegszeit des Detektors muss dafür allerdings kürzer sein, als die schnellen Oszillationen des elektrischen Feldes. Dies ist jedoch experimentell nur mit großem Aufwand möglich. Daher wird die Leistung nicht über eine optische Periode $T = 2\pi/\omega_0$, sondern über die Anstiegszeit des Detektors gemessen. Damit lässt sich die zeitliche Entwicklung der sich langsam ändernden Einhüllenden messen. Wenn die Anstiegszeit des Detektors noch größer wird, wird auch über die Zeit integriert, und es kann nur noch die Pulsennergie \mathcal{W} gemessen werden:

$$\mathcal{W} = \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{P}(t') dt' \quad (1.6)$$

Bei einem bekannten Querschnitt des Strahlprofils kann mit Hilfe der gemessenen Leistung die (instantane) Intensität (W/cm^2) bestimmt werden:

$$I(t) = \varepsilon_0 c n \frac{1}{T} \int_{t-T/2}^{t+T/2} E^2(t') dt' \quad (1.7)$$

Mit der SVEA ergibt sich:

$$I(t) = \frac{1}{2} \varepsilon_0 c n \mathcal{E}^2(t) = 2 \varepsilon_0 c n \tilde{E}^+(t) E^-(t) = \frac{1}{2} \varepsilon_0 c n \tilde{\mathcal{E}}(t) \tilde{\mathcal{E}}^*(t) \quad (1.8)$$

Die spektralen Eigenschaften eines Pulses werden typischerweise ohne Zeitauflösung mit einem Spektrometer gemessen. Die gemessene Größe ist die spektrale Intensität:

$$S(\Omega) = \left| \eta(\omega) \tilde{E}^+(\Omega) \right|^2 \quad (1.9)$$

η ist ein Skalierungsfaktor der von der spektralen Empfindlichkeit (CDD-Sensor, Gitter) und der Auflösung des Spektrometers abhängt. Für ein ideales Spektrometer ist die gemessene spektrale Intensität:

$$S(\Omega) = \frac{\varepsilon_0 c n}{4\pi} \left| \tilde{\mathcal{E}}(\Omega - \omega_0) \right| \quad (1.10)$$

Pulsdauer und spektrale Breite

Die Pulsdauer τ_p ist definiert als die Halbwertsbreite (full width at half maximum = FWHM) des Intensitätsprofils $|\tilde{\mathcal{E}}(t)|^2$ und die spektrale Breite $\Delta\omega_p$ als die FWHM der spektralen Intensität $|\tilde{\mathcal{E}}(\Omega)|^2$. Allerdings existieren noch andere Definitionen für die Pulsbreite. Abhängig von der Form der Pulse bietet es sich aus mathematischen Gründen an andere Pulsdauern zu definieren. Z.B. wird für Gaußpulse mit einer Pulsform

$$\tilde{\mathcal{E}}(t) = \mathcal{E} e^{-(t/\tau_G)^2} \quad (1.11)$$

die Pulsdauer $\tau_G = \tau_p / \sqrt{2 \ln 2}$ bei $1/e$ des Maximums der Intensität $|\tilde{\mathcal{E}}(t)|^2$ verwendet. Gaußpulse werden am meisten zitiert, allerdings gibt es noch weitere wichtige Laserprofile. Einige Standard-Laserpulsprofile und deren Eigenschaften sind in Tabelle 1.2 zusammengestellt. Da das elektrische Feld in der Zeit und Frequenzdomäne durch die Fourier-Transformation miteinander verbunden ist, kann die spektrale Breite $\Delta\omega_p$ und die Pulsdauer τ_p nicht unabhängig von einander variieren. Daher gibt es ein minimales Zeit-Bandbreite-Produkt (time-bandwidth product = TWP):

$$\Delta\omega_p \tau_p = 2\pi \Delta\nu_p \tau_p \geq 2\pi c_B \quad (1.12)$$

c_B ist eine numerische Konstante, die von der aktuellen Pulsform abhängt (siehe Tabelle 1.2). $\Delta\nu_p$ ist die spektrale Breite in Bezug zur Mittenfrequenz ν_0 . Diese Relation kann auch mit der Heisenbergschen Unschärferelation verstanden werden. Wenn ein Puls den minimalen Wert besitzt, ist er bandbreitenlimitiert, transformationsbegrenzt oder Fourier-limitiert.

Form	Intensitätsprofil $I(t)$	τ_p FWHM	Spektrales Profil $S(\Omega)$	$\Delta\omega_p$ FWHM	c_B
Gauß	$e^{-2(t/\tau_G)^2}$	$1.177/\tau_G$	$e^{-\left(\frac{\Omega\tau_G}{2}\right)^2}$	$2.355/\tau_G$	0.441
Sech ²	$\operatorname{sech}^2(t/\tau_s)$	$1.763/\tau_s$	$\operatorname{sech}^2\left(\frac{\pi\Omega\tau_s}{2}\right)$	$1.122/\tau_s$	0.315
Lorentz	$[1 + (t/\tau_L)^2]^{-2}$	$1.287/\tau_L$	$e^{-2 \Omega \tau_L}$	$0.693/\tau_L$	0.142
Asym. sech	$[e^{t/\tau_a} + e^{-3t/\tau_a}]^{-2}$	$1.043/\tau_a$	$\operatorname{sech}\left(\frac{\pi\Omega\tau_a}{2}\right)$	$1.677/\tau_a$	0.278
Rechteck	1 für $ t/\tau_r \leq 1$ 0 sonst	τ_r	$\operatorname{sinc}^2\Omega\tau_r$	$2.78/\tau_r$	0.443

Tabelle 1.2 Beispiele für Standard-Pulsprofile. Die spektralen Werte sind für nicht modulierte Pulse. Nach Diels und Rudolph [2006].

1.3.3 Gaußpuls

Einige der beschriebenen Relationen sollen im Folgenden am Beispiel eines Pulses mit einer Gaußform beschrieben werden. Gaußförmige Pulse sind mathematisch gut zu beschreiben, da die Fouriertransformation eines Gaußpulses wieder ein Gaußpuls ist, kommen allerdings nicht am häufigsten vor. Für einen Gaußpuls mit einem linearen Chirp ist das elektrische Feld geben durch:

$$\tilde{\mathcal{E}}(t) = \mathcal{E}_0 e^{-(t/\tau_G)^2} e^{-ia(t/\tau_G)^2} = \mathcal{E}_0 e^{-(1+ia)(t/\tau_G)^2} \quad (1.13)$$

mit einer Pulsdauer von:

$$\tau_p = \sqrt{2 \ln(2)} \tau_G \quad (1.14)$$

Bei dieser Definition ist der Betrag der komplexen Einhüllenden wieder eine Gaußfunktion $|\mathcal{E}_0| e^{-t^2/\tau_G^2}$. Ebenso ist die Intensität $I(t)$ wieder eine Gaußfunktion. Die Phase ist eine quadratische Funktion $\varphi(t) = -at^2/\tau_G^2$. Der Chirpparameter a ist so definiert, dass ein positiver Chirpparameter a einen negativen Chirp erzeugt. Wenn $a = 0$ ist, ist der Puls ungechirpt bzw. transformationsbeschränkt. Durch Fourier-Transformation von Gleichung 1.13 erhält man:

$$\tilde{\mathcal{E}}(\Omega) = \frac{\mathcal{E}_0 \sqrt{\pi} \tau_G}{\sqrt[4]{1+a^2}} e^{\left(i\psi - \frac{\Omega^2 \tau_G^2}{4(1+a^2)}\right)} \quad (1.15)$$

$$\psi(\Omega) = -\frac{1}{2} \arctan(a) + \frac{a \tau_G^2}{4(1+a^2)} \quad (1.16)$$

Aus Gleichung 1.15 und Gleichung 1.9 erhält man die spektrale Intensität, die wiederum eine Gaußform besitzt:

$$S(\omega_0 + \Omega) = \frac{|\eta|^2 \pi \mathcal{E}_0^2 \tau_G^2}{\sqrt{1+a^2}} e^{-\frac{\Omega^2 \tau_G^2}{2(1+a^2)}} \quad (1.17)$$

Die spektrale Breite (FWHM) ist dann:

$$\Delta\omega_p = 2\pi\Delta\nu_p = \frac{1}{\tau_p} 4 \ln 2 \sqrt{1+a^2} = \frac{1}{\tau_G} \sqrt{8 \ln 2 (1+a^2)} \quad (1.18)$$

Für das Zeit-Bandbreite-Produkt (TWP) ergibt sich damit:

$$\Delta\nu_p\tau_p = \frac{2 \ln 2}{\pi} \sqrt{1 + a^2} \quad (1.19)$$

Abbildung 1.8 zeigt drei Gaußpulse mit einem unterschiedlichen Chirpparameter. Ein linearer Chirp verbreitert das Spektrum, neue spektrale Komponenten kommen hinzu und das TWP wird um einen Faktor $\sqrt{1 + a^2}$ größer. Die spektrale Phase aus Gleichung 1.16 ändert sich quadratisch mit der Frequenz, wenn der Eingangspuls linear gechirpt ist. Obwohl das nur für Gaußpulse exakt stimmt, ist das auch für andere Pulsformen näherungsweise richtig.

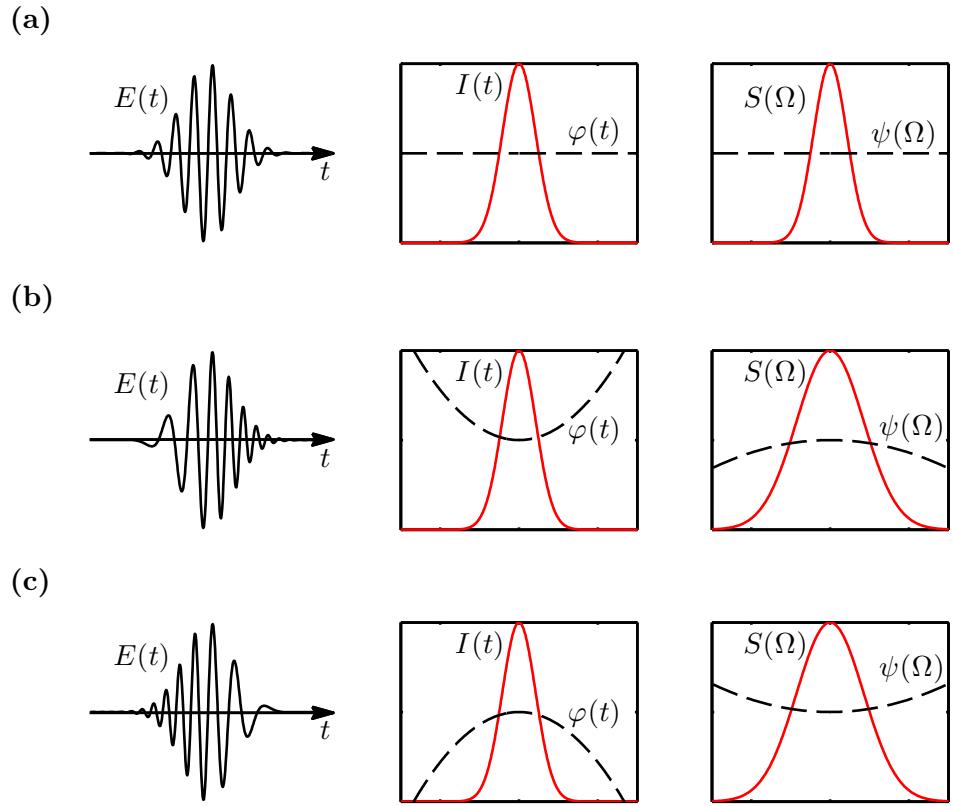


Abbildung 1.8 Zeitliche und spektrale Profile von drei Gaußpulsen. Links ist das elektrische Feld aufgetragen. Die mittlere Spalte zeigt die Intensität $I(t)$ zusammen mit der Phase $\varphi(t)$ und die rechte Spalte die spektrale Intensität $S(\Omega)$ zusammen mit der spektralen Phase $\psi(\Omega)$ (a) transformationsbegrenzter Puls (b) positiv gechirpter Puls (c) negativ gechirpter Puls. Nach Saleh und Teich [2008].

1.3.4 Pulsausbreitung

In den vorherigen Abschnitten wurde nur die zeitliche und spektrale Abhängigkeit des Pulses betrachtet. Bei der Ausbreitung von Pulsen und dem Durchgang durch Materie muss ebenfalls die örtliche Abhängigkeit betrachtet werden. Betrachtet man die Ausbreitung eines linear polarisierten elektrischen Feldes nur in z -Richtung mit einer homogenen Verteilung in x - und y -Richtung, kann die sogenannte reduzierte Wellengleichung aus den Maxwellgleichungen geschrieben werden:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) E(z, t) = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} P(z, t) \quad (1.20)$$

mit μ_0 für die magnetische Feldkonstante. P ist die Polarisation und beschreibt den Einfluss des Mediums auf das elektrische Feld sowie die Antwort des Mediums auf das äußere elektrische Feld. Die Polarisation kann in zwei Anteile aufgetrennt werden, in einen linearen und einen nichtlinearen Anteil:

$$P = P^L + P^{NL} \quad (1.21)$$

In der klassischen Optik wird nur der lineare Anteil betrachtet. In der nichtlinearen Optik spielt ebenfalls der nichtlineare Anteil eine wichtige Rolle, um z.B. Effekte wie gesättigte Absorption, Frequenzverdopplung (second harmonic generation = **SHG**) oder Selbstphasenmodulation (**SPM**) zu erklären. Die Auswirkungen einer linearen Polarisation werden in Abschnitt [1.3.4.1](#) und die für diese Arbeit relevanten Auswirkungen einer nichtlinearen Polarisation in Abschnitt [1.3.4.2](#) beschrieben.

1.3.4.1 Pulsausbreitung im linearen Regime

Im linearen Fall hängt die Polarisation über die elektrische Suszeptibilität χ linear vom elektrischen Feld ab:

$$\tilde{P}(z, t) = \varepsilon_0 \chi(t) \tilde{E}(z, t)^1 \quad (1.22)$$

χ ist eine Materialeigenschaft und beschreibt die Polarisierbarkeit eines Mediums durch ein einfallendes elektrisches Feld. Damit kann die reduzierte Wellengleichung [1.20](#) stark vereinfacht werden. Die Lösung im Frequenzraum bei Ausbreitung in z -Richtung lautet:

$$\tilde{E}(\Omega, z) = \tilde{E}(\Omega, 0) e^{-ik(\Omega)z} \quad (1.23)$$

$k(\Omega)$ ist die Wellenkreiszahl, die zusammen mit der Ausbreitungsrichtung den Wellenvektor \mathbf{k} beschreibt. Sie ist mit dem Brechungsindex $n(\Omega)$ des Materials über die Dispersionsrelation verbunden:

$$k^2(\Omega) = \frac{\Omega^2}{c^2} n^2(\Omega) \quad (1.24)$$

In der **SVEA** kann damit geschrieben werden:

$$\tilde{E}(t, z) = \frac{1}{2} \tilde{\mathcal{E}}(t, z) e^{i(w_0 t - k_0 z)} \quad (1.25)$$

Die Einhüllende $\tilde{\mathcal{E}}(t, z)$ ändert sich jetzt langsam in Raum und Zeit und bewegt sich mit der Gruppengeschwindigkeit:

$$v_g = \left(\frac{dk}{d\Omega} \Big|_{\omega_0} \right)^{-1} \quad (1.26)$$

Allgemein werden bei der Pulsausbreitung durch ein lineares Element die spektralen Komponenten eines Pulses unterschiedlich stark gedämpft. Die spektrale Phase erfährt damit eine unterschiedliche Phasenverschiebung abhängig von den spektralen Komponenten. Daher bietet es sich bei der Betrachtung der Ausbreitung eines optischen Pulses im Medium an, das elektrische Feld im Frequenzraum zu betrachten. Damit ergibt sich:

$$\tilde{E}_{out}(\Omega) = R(\Omega) e^{-i\Psi(\Omega)} \tilde{E}_{in}(\Omega) \quad (1.27)$$

der erste Term kann zusammengefasst werden zu:

$$\tilde{H}(\Omega) = R(\Omega) e^{-i\Psi(\Omega)} \quad (1.28)$$

¹ab hier wird für \tilde{E}^+ nur noch \tilde{E} geschrieben

$\tilde{H}(\Omega)$ ist die Transferfunktion des linearen optischen Mediums, die die Reaktion des Mediums auf das einfallende elektrische Feld beschreibt. $R(\Omega)$ ist die Amplitudenantwort und $\Psi(\Omega)$ die Phasenverzögerung, die auf die spektralen Komponenten Ω des einfallenden elektrischen Feldes wirken. Die herausgehende spektrale Phase des Pulses setzt sich damit aus der Phasenverzögerung des Mediums und der eingehenden spektralen Phase zusammen:

$$\psi(\Omega)_{out} = \Psi(\Omega) + \psi(\Omega)_{in} \quad (1.29)$$

Diese einfache Addition gilt nur für die spektrale Phase, nicht für die zeitliche Phase. In der Zeitdomäne ergibt sich das herausgehende elektrische Feld mit Hilfe einer Fourier-Transformation aus Gleichung 1.27:

$$\tilde{E}(t)_{out} = \frac{1}{2\pi} R \int_{-\infty}^{+\infty} \tilde{E}_{in}(\Omega) e^{-i\Psi(\Omega)} e^{i\Omega t} d\Omega \quad (1.30)$$

Eine hilfreiche Darstellung ist es die spektrale Phase Taylor zu entwickeln:

$$\Psi(\Omega) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n \Psi}{d\Omega^n} \bigg|_{\omega_0} (\Omega - \omega_0)^n \quad (1.31)$$

Bei genauerer Betrachtung von Gleichung 1.23 und Gleichung 1.27 ist eine Analogie zwischen beiden Gleichungen für $R(\Omega) = 1$ und $\Psi(\Omega) = k(\Omega)z$ festzustellen. Die Ursache für diese Analogie ist die Tatsache, dass dispersive transparente Medien ein Beispiel für lineare Elemente sind. In diesem Fall kann für das elektrische Feld in der SVEA folgender Ausdruck verwendet werden:

$$\tilde{\mathcal{E}}(\Omega, z)_{out} = \tilde{\mathcal{E}}_{in}(\Omega, 0) e^{\left[-i \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} k_0^{(n)} (\Omega - \omega_0)^n z \right]} \quad (1.32)$$

mit $k_0^{(n)} = (d^n/d\Omega^n)k(\Omega)|_{\omega_0}$. Die ersten vier Terme der Taylorentwicklung lauten ausgeschrieben und als Funktion der Wellenlänge λ :

$$0. \text{ Term : } k_0$$

$$1. \text{ Term : } k'_0 = \frac{1}{v_g(\Omega)} = \frac{1}{c} \left(n - \lambda \frac{dn}{d\lambda} \right) \quad (1.33)$$

$$2. \text{ Term : } k''_0 = \frac{d}{d\Omega} \left[\frac{1}{v_g(\Omega)} \right] = \left(\frac{\lambda}{2\pi c} \right) \frac{1}{c} \left(\lambda^2 \frac{d^2 n}{d\lambda^2} \right) \quad (1.34)$$

$$3. \text{ Term : } k'''_0 = - \left(\frac{\lambda}{2\pi c} \right)^2 \frac{1}{c} \left(3\lambda^2 \frac{d^2 n}{d\lambda^2} + \lambda^3 \frac{d^3 n}{d\lambda^3} \right) \quad (1.35)$$

Die einzelnen Terme der Taylorentwicklung haben unterschiedliche Auswirkungen auf den Puls in der Zeitdomäne: Der nullte Term bewirkt keine Änderungen der Einhüllenden, es ändert sich die Phase der Trägerwelle. Der erste Term ändert ebenfalls die Form der Einhüllenden nicht, der Puls erfährt eine zeitliche Verzögerung. Der zweite Term wird als die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (group velocity dispersion = GVD) bezeichnet und gibt an, wie viel Gruppenlaufzeit der Puls pro Wegstrecke erfährt (Einheit $\text{fs}^2/\mu\text{m}$). Dieser

Term ist für das Auseinanderlaufen der Einhüllenden in der Zeitdomäne verantwortlich und bewirkt eine Verbreiterung der Pulsdauer. Wenn dieser Term > 0 ist, dann spricht man von einer positiven GVD. Der dritte Term verändert zusätzlich noch die äußere Form des Pulses und es treten asymmetrisch kleine Nebenmaxima auf (Einheit $\text{fs}^3/\mu\text{m}$). Die spektrale Intensität $|\tilde{\mathcal{E}}(\Omega, z)|^2$ ändert sich nicht, d.h. die spektrale Breite bleibt konstant. Die Terme können auch direkt als Terme der Phase angegeben werden, da $\Psi(\Omega) = k(\Omega)z$. In diesem Fall wird der zweite Term als die Gruppenlaufzeit-Dispersion (group delay dispersion = **GDD**) oder auch Dispersion zweiter Ordnung (second order dispersion = **SOD**) bezeichnet. Dies beschreibt dann die Dispersion, die nach Übertragung über eine Wegstrecke z dem Puls hinzugefügt wurde (Einheit fs^2). Das gleiche gilt für den dritten Term, der dann die Dispersion dritter Ordnung (third order dispersion = **TOD**) angibt (Einheit fs^3).

Bei der Wechselwirkung der ultrakurzen Pulse mit einem transparenten Medium, wie z.B. Glas, können die Terme direkt mit Hilfe der Sellmeier Gleichung berechnet werden. Die Sellmeier Gleichung ist eine Beschreibung des Brechungsindex als Funktion der Wellenlänge:

$$n(\lambda)^2 - 1 = \sum \frac{B_k \lambda^2}{\lambda^2 - C_k} \quad (1.36)$$

B_k und C_k sind die experimentell ermittelten Sellmeier-Koeffizienten, die üblicherweise bis zu einer Ordnung von $k = 3$ angegeben werden. Für Materialien die ein $dn/d\lambda > 0$ spricht man von normaler Dispersion, für Materialien die ein $dn/d\lambda < 0$ haben, spricht man von anormaler Dispersion. Die meisten Materialien besitzen eine normale Dispersion für Wellenlängen bis ins Nahinfrarot. Für Wellenlängen im Infraroten dreht sich das Vorzeichen um und die Dispersion wird anormal. Da bei dem zweiten Term aus Gleichung 1.34 alle Komponenten bis auf $d^2n/d\lambda^2$ positiv sind, gibt $d^2n/d\lambda^2$ das Vorzeichen der GVD an. Für normale Dispersion ergibt sich damit eine positive GVD und für anormale GVD eine negative GVD.

Beispiel: Gaußpuls und linearer Chirp

Gechirpte Gaußpulse (siehe Gleichung 1.13) können nach Gleichung 1.27 in der Frequenzdomäne mit einem Entwicklungsterm $\exp(-i\frac{1}{2}k_0''\Omega^2 z)$ multipliziert werden. Der Entwicklungsterm ist der zweite Term aus Gleichung 1.32 und ist für den linearen Chirp verantwortlich. Durch Fourier-Transformation kann das elektrische Feld in der Zeitdomäne berechnet werden und damit die Pulsdauer an der Stelle z , $\tau_G(z)$. (Die genaue Herleitung siehe Diels und Rudolph [2006, S.33-34]). Für anfangs fourierlimitierte Gaußpulse ($a = 0$) ergibt sich:

$$\tau_G(z) = \tau_{G0} \sqrt{1 + \left(\frac{2|k_0''|z}{\tau_{G0}^2} \right)^2} = \tau_{G0} \sqrt{1 + \left(\frac{z}{L_d} \right)^2} \quad (1.37)$$

L_d definiert die charakteristische Länge:

$$L_d = \frac{\tau_{G0}^2}{2|k_0''|} \quad (1.38)$$

τ_{G0} ist die anfängliche Pulsdauer. Die charakteristische Länge kann auch mit der Pulsdauer $\tau_{p0} = \sqrt{2 \ln 2} \tau_{G0}$ definiert werden und wird dann als die so genannte dispersive Länge

bezeichnet:

$$L_D = \frac{\tau_{p0}^2}{|k_0''|} \quad (1.39)$$

Damit ergibt sich für Gaußpulse $L_D \approx 2.77L_d$.

Für anfangs gechirpte Gaußpulse ($a \neq 0$) gilt allgemein für die Pulsdauer und die Phase an der Stelle z :

$$\tau_G(z) = \sqrt{\frac{4}{x}(x^2 + y^2(z))} \quad (1.40)$$

$$\varphi(t, z) = -\frac{y(z)}{4(x^2 + y^2(z))} t^2 \quad (1.41)$$

mit

$$x = \frac{\tau_{G0}^2}{4(1 + a^2)} \quad (1.42)$$

und

$$y(z) = \frac{a\tau_{G0}^2}{4(1 + a^2)} - \frac{k_0''z}{2} \quad (1.43)$$

1.3.4.2 Pulsausbreitung im nichtlinearen Regime

In diesem Abschnitt soll nur auf die Selbstphasenmodulation näher eingegangen werden (siehe Boyd [2008]; Diels und Rudolph [2006]; Saleh und Teich [2008]), da in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der Wechselwirkung ultrakurzer Pulse mit dem Faserkernmaterial liegt. Der dominierende Effekt ist dabei die Selbstphasenmodulation. Für die Selbstphasenmodulation ist hauptsächlich der optische Kerr-Effekt verantwortlich. Der optische Kerr-Effekt besagt, dass der Brechungsindex von der Intensität des einfallenden elektrischen Felds abhängig wird. Die mathematische Beschreibung für den intensitätsabhängigen Brechungsindex kann aus der Taylor-Entwicklung der Polarisation abgeleitet werden:

$$P = \varepsilon_0 \chi(E) E = \varepsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots + \chi^{(n)} E^n + \dots) \quad (1.44)$$

χ ist die elektrische Suszeptibilität. $\chi^{(1)}$ ist die lineare Suszeptibilität und $\chi^{(n)}$ die nichtlineare Suszeptibilität der n -ten Ordnung. In Gleichung 1.44 sind E und P der Einfachheit halber skalare Größen. $\chi^{(n)}$ ist allerdings ein Tensor der $(i + 1)$ Stufe. Für transparente Medien kann $\chi^{(3)}$ näherungsweise als eine reelle Größe angesehen werden². Bei Medien, die eine Inversionssymmetrie besitzen, fallen die Terme mit geraden Symmetrieeigenschaften ($\chi^{(2)}$) weg. Inversionssymmetrische Materialien sind z.B. die meisten Gläser, einige Halbleiter und organische Materialien. In diesem Fall dominiert der

² $\chi^{(3)}$ ist ein Tensor 4. Stufe. Im Fall von linear polarisiertem Licht in isotropen Medien oder wenn das Licht entlang der kubischen Achse eines kubischen Kristalls polarisiert ist, kann für $\chi^{(3)}$ $\chi_{1111}^{(3)}$ genommen werden [Adair, Chase und Payne, 1989]

dritte Term ($\chi^{(3)}$). Mit diesen Näherungen kann für die Polarisation geschrieben werden:

$$\tilde{P}_x^{(3)} = 3\epsilon_0\chi^{(3)}|\tilde{E}_x|^2\tilde{E}_x \quad (1.45)$$

Wird diese Relation in die Wellengleichung 1.20 eingesetzt, kann der Brechungsindex n folgendermaßen definiert werden:

$$n = \sqrt{(1 + \chi^{(1)} + \chi^{(3)}|\tilde{\mathcal{E}}(t)|^2)} \quad (1.46)$$

Mit der Definition des Brechungsindex $n_0 = \sqrt{1 + \chi^{(1)}}$ ergibt sich damit:

$$n = n_0\sqrt{1 + \chi^{(3)}|\tilde{\mathcal{E}}(t)|^2/n_0^2} \quad (1.47)$$

Da der nichtlineare Anteil sehr viel kleiner als n_0 ist, folgt mit Hilfe der Taylorentwicklung:

$$n \approx n_0 + \chi^{(3)}|\tilde{\mathcal{E}}(t)|^2/2n_0^2 \quad (1.48)$$

Mit Hilfe der Definition der Intensität aus Gleichung 1.8 folgt für den intensitätsabhängigen Brechungsindex:

$$n(I) = n_0 + n_2 I(t) \quad (1.49)$$

$n_2 = \bar{n}_2/(\epsilon_0 c n_0)$ bezeichnet den nichtlinearen Brechungsindex zweiter Ordnung und beschreibt die Stärke der Kopplung zwischen dem elektrischen Feld und dem Brechungsindex. Dies beschreibt den optischen Kerr-Effekt. Vor allem in älteren Publikationen wird \bar{n}_2 in esu Einheiten verwendet. Hingegen wird in neueren Publikationen eher n_2 in der Einheit cm^2/W verwendet. Die Umrechnung lautet:

$$n_2(\text{cm}^2/\text{W}) \approx 4,19 \times 10^{-3} \frac{\bar{n}_2(\text{esu})}{n_0} \quad (1.50)$$

Die Phase eines Pulses kann damit geschrieben werden:

$$\varphi(t, z) = \varphi_0(t) - \frac{k_0 \bar{n}_2}{n_0} z \mathcal{E}_0^2(t) \quad (1.51)$$

\mathcal{E}_0 ist die Pulsamplitude an der Stelle $z = 0$, wobei sich die Pulsamplitude nicht ändert. Damit ergibt sich die instantane Frequenz, die die Pulsmodulation angibt, zu:

$$\omega(t) = \frac{\partial \varphi}{\partial t} = \frac{d\varphi_0}{dt} - \frac{\bar{n}_2 k_0}{n_0} z \frac{d}{dt} \mathcal{E}_0^2(t) \quad (1.52)$$

Der intensitätsabhängige Brechungsindex hat somit zur Folge, dass innerhalb des elektrischen Feldes eines Pulses die unterschiedlichen Bereiche einen anderen Brechungsindex „erfahren“. Damit verändert sich die Phase entlang des Pulses (siehe Abbildung 1.9). In der Zeitdomäne ändert sich die Pulsfom nicht. Hingegen kommen in der Frequenzdomäne neue Frequenzen dazu und das Spektrum verbreitert sich. Die SPM alleine würde den Puls somit zeitlich nicht verbreitern, ist aber in der Praxis wegen der zusätzlich auftretenden Dispersion immer auch mit einer zeitlichen Pulsverbreiterung

verknüpft.

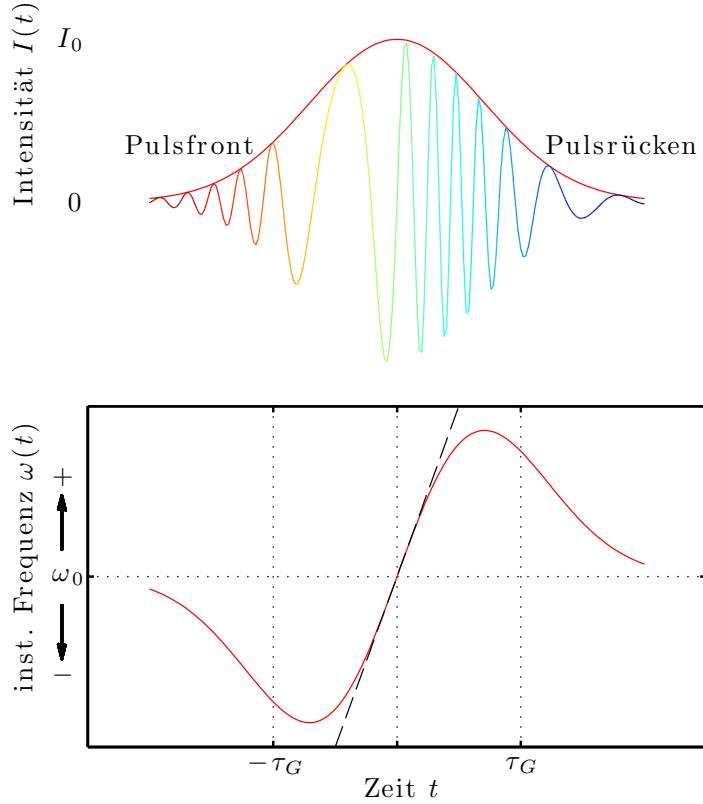


Abbildung 1.9 Änderung der instantanen Frequenz bei Selbstphasenmodulation. Ein Gaußpuls propagiert durch ein nichtlineares Medium und erfährt dabei Selbstphasenmodulation. Die instantane Frequenz gibt die Änderung der Phase entlang der Ausbreitung an. Im vorderen Teil des Pulses (Pulsfront) werden die Frequenzen zu niedrigeren Frequenzen geschoben, im hinteren Teil des Pulses (Pulsrücken) werden die Frequenzen zu höheren Frequenzen geschoben. Im Zentrum ist die Änderung der instantanen Frequenz linear.

1.3.5 Pulskompression

In Kapitel 1.3.4.1 wurde die **GVD** beschrieben, die bei ultrakurzen Pulsen auftritt, wenn diese dispersive Medien passieren. Die GVD bewirkt ein zeitliches Auseinanderlaufen der Pulse. Um diese meist positive GVD zu kompensieren, können dispersive Elemente, wie Prismen oder Gitter, verwendet werden, die eine räumliche Auf trennung der spektralen Komponenten eines Pulses zur Folge haben. Durch spezielle geometrische Anordnungen werden die spektral längeren Wellenlängen gezwungen, einen längeren optischen Weg zurückzulegen als die spektral kürzeren Wellenlängen. Die damit erzeugte negative GVD kann die vorher aufgetretene Verzögerung der spektral kürzeren Wellenlängen beim Durchgang durch das disperse Material kompensieren. In Abbildung 1.10 sind zwei Beispiele zur Erzeugung negativer GVD gezeigt: ein Gitterkompressor [Treacy, 1969] und ein Prismenkompressor [Fork, Martinez und Gordon, 1984]. Die Funktionsweise ist im Prinzip für beide Kompressoren ähnlich, da die Ursache ein Element mit

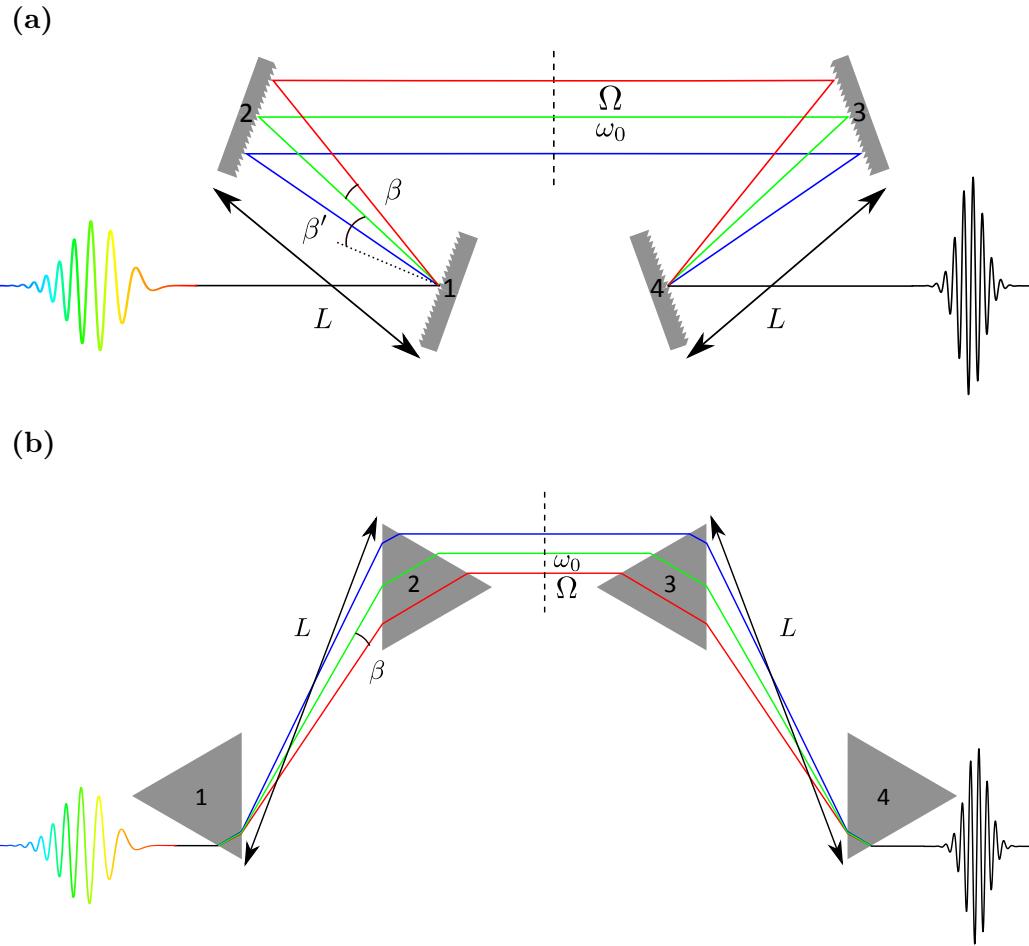


Abbildung 1.10 Funktionsweise (a) Gitter- und (b) Prismenkompressor

Winkeldispersion ist, das eine Phasenverzögerung der spektralen Komponenten bewirkt. Die Phasenverschiebung, bzw. Verzögerung ist dann:

$$\Psi(\Omega) = \frac{\Omega}{c} L \cos \beta \quad (1.53)$$

Der Winkel β befindet sich zwischen dem abgelenkten Strahl der zentralen Trägerfrequenz ω_0 und dem Strahl bei der Frequenz Ω . Nach der zurückgelegten Wegstrecke L existiert dann bei kleinen Ablenkungen (= kleines β) näherungsweise eine GDD von:

$$\frac{d^2\Psi}{d\Omega^2} \Big|_{\omega_0} \approx -\frac{L\omega_0}{c} \left(\frac{d\beta}{d\Omega} \Big|_{\omega_0} \right)^2 \quad (1.54)$$

Bei einer Anordnung von vier Elementen, wie in Abbildung 1.10, fächert das erste Element den Strahl spektral auf und bewirkt damit eine Winkeldispersion $d\beta/d\Omega$. Das zweite Element parallelisiert die spektralen Komponenten. Das dritte Element rekombiniert den Strahl, der dann im vierten Element wieder spektral zusammengefügt wird. In Abbildung 1.10 ist eine gestrichelte Ebene für die Symmetrieebene eingezeichnet, an der normalerweise der Kompressor gefaltet werden kann. Mit einem Spiegel kann dadurch der Kompressor

auch mit nur zwei Elementen aufgebaut werden. Während in einem Gitterkompressor der negative Beitrag durch den Weg ($2L$) zwischen den beiden Gittern in Luft erzeugt wird, wird der hauptsächliche negative Beitrag in einem Prismenkompressor durch die verzögernde Glasstrecke für die längere Wellenlänge durch das zweite und dritte Prisma erzeugt.

Gitterkompressor

Zur Berechnung der **GDD** im Fall des Gitterkompressors wie in Abbildung 1.10(a) kann folgende Gleichung verwendet werden:

$$\frac{d^2\Psi}{d\Omega^2}\Big|_{\omega_0} = -\frac{\lambda_0}{2\pi c^2} \left(\frac{\lambda_0}{d}\right)^2 \frac{b}{\cos^3 \beta'(\lambda_0)} \quad (1.55)$$

b ist die Länge der Flächennormalen auf die Gitterebenen zwischen dem ersten und zweiten (bzw. auch dem dritten und vierten) Gitter. $L = b/\cos \beta'$ ist die Wegstrecke des Lichtstrahls bei der zentralen Trägerfrequenz zwischen zwei Gittern. d^{-1} ist die Gitterkonstante, die angibt wie viele Linien pro mm das Gitter besitzt. Damit kann Gleichung 1.55 auch geschrieben werden:

$$\frac{d^2\Psi}{d\Omega^2}\Big|_{\omega_0} = -\frac{\lambda_0}{2\pi c^2} \left(\frac{\lambda_0}{d}\right)^2 \frac{1}{\cos^2 \beta'(\lambda_0)} L = k_0'' L \quad (1.56)$$

Prismenkompressor

Die **GDD** eines Prismenkompressors kann nach Fork, Martinez und Gordon [1984] folgendermaßen berechnet werden:

$$\frac{d^2\Psi}{d\Omega^2}\Big|_{\omega_0} = \frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2} \left[4L \left\{ \left[\frac{d^2n}{d\lambda^2} + \left(2n - \frac{1}{n^3} \right) \left(\frac{dn}{d\lambda} \right)^2 \right] \sin \beta - 2 \left(\frac{dn}{d\lambda} \right)^2 \cos \beta \right\} \right] \quad (1.57)$$

Dabei gilt, dass der einfallende Strahl in dem Winkel geringster Abweichung und damit im Brewster Winkel einfällt. Da β normalerweise relativ klein und $\sin \beta \ll \cos \beta$, kann Gleichung 1.57 vereinfacht werden zu:

$$\frac{d^2\Psi}{d\Omega^2}\Big|_{\omega_0} = \frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2} \left[-8L \left(\frac{dn}{d\lambda} \right)^2 \right] \quad (1.58)$$

Prinzipiell gilt, dass Gitter, abhängig von der Gitterkonstante, dispersiver sind als Prismen. Der notwenige Abstand zwischen Gittern ist damit kleiner als der für Prismen. Für lange Wegstrecken durch transparente Medien, bzw. für eine große GDD, sind daher Gitter platzsparender.

Für beide Kompressorarten kann auch noch die Dispersion der dritten Ordnung, **TOD**, berechnet werden. Bei Gitterkompressoren ist dieser Term immer negativ, bei Prismenkompressoren ist die TOD meist positiv. Beim Durchgang durch transparente Medien wird meist eine negative TOD erzeugt. Für die Kompression von sehr kurzen Pulsen (<100 fs) eignen sich Prismen besser, da diese eine negative TOD erzeugen und damit der im Medium erzeugten positiven TOD entgegenwirken. Gitter können in

Kombination mit Prismen verwendet werden, um TOD optimal zu kompensieren (z.B.: mit Grism Kane und Squier [1997]).

Eine andere Möglichkeit Pulse zu komprimieren bietet die Verwendung gechirpter Spiegel [Szipöcs u. a., 1994], die eine spezielle Beschichtung haben. Bei der Reflexion erreicht man durch Interferenz, dass aus unterschiedlichen Schichten verschiedene Wellenlängen reflektiert werden. Damit besitzen unterschiedliche Wellenlängen eine unterschiedliche Eindringtiefe in den Spiegel. Die Laufzeit der einzelnen Wellenlängen kann somit kontrolliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau Zwei-Photonen-Mikroskop

Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über den verwendeten Messaufbau. Der Aufbau ist dabei angelehnt an den Messaufbau, der in der Publikation von Göbel u. a. [2004] beschrieben ist. Der Strahl aus einem Femtosekundenlaser (Kapitel 2.2) wird mit Hilfe des

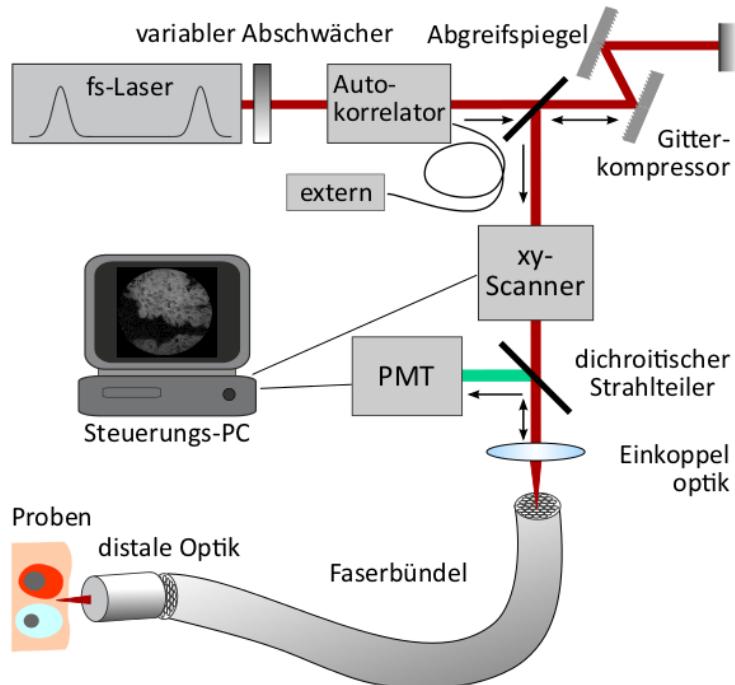


Abbildung 2.1 Aufbau des Zwei-Photonen-Endomikroskops

Scannerkopfes (Kapitel 2.3) in eine x-y Bewegung gebracht. Ein variabler Abschwächer ermöglicht die Einstellung der Laserleistung. Die Einkoppeloptik fokussiert den Laserstrahl telezentrisch auf die Eingangsfläche eines Faserbündels (Kapitel 2.4 und 2.5). Durch die Scannerbewegung und die telezentrische Abbildung werden die einzelnen Faserkerne des Faserbündels abgerastert. Am Ausgang des Faserbündels wird mit Hilfe einer distalen Optik (Kapitel 2.6) das Licht aus den einzelnen Fasern auf die Probe fokussiert. Ein Teil des angeregten Fluoreszenzlichts wird von der distalen Optik gebündelt und über das Faserbündel und einen dichroitischen Strahlteiler mit einem Photomultiplier (PMT) detektiert. Das Fluoreszenzlicht wird damit punktweise aufgezeichnet, mit der LabVIEW basierte Scan-Software „Colibri“ verrechnet und dargestellt (Kapitel 2.7).

Der Gitterkompressor (Kapitel 2.8) kann in den Aufbau integriert werden, um die Pulse am Fasereingang negativ prechirpen zu können und somit kürzere Pulse am Faserausgang

zu bekommen. Die Pulscharakterisierung erfolgt über die Messung der Pulsdauer mit Hilfe eines Autokorrelators (Kapitel 2.9), der spektralen Breite mit Hilfe eines Spektrometers (USB 2000, Ocean Optics; Mikropack Ostfildern) und der mittleren Leistung (Fieldmaster, Coherent GmbH; Dieburg). Die Wechselwirkung der ultrakurzen Lichtpulse bei dem Durchgang durch die Lichtwellenleiter wurde analysiert und mit Simulationen (Kapitel 2.10) verglichen.

Als Proben wurden verschiedene Testobjekte verwendet, wie Pollenkörner oder gefärbte Papierfasern. Außerdem wurden noch Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gewebschnitte von Kaninchenblasengewebe (Dicke ca. 5 μm) verwendet. In dieser Arbeit wurde eine topisch applizierbare Färbetechnik mit Kresylviolett von frischem Blasengewebe etabliert (Kapitel 2.11). Zwei-Photonen-Endoskopie Bilder des frischen Gewebes konnten aus den später diskutierten Gründen im Rahmen der Arbeit nicht erstellt werden.

2.2 Laserquellen

2.2.1 Ultrakurze Laserquellen für Zwei-Photonen-Anregung

Für eine effektive Zwei-Photonen-Anregung werden üblicherweise ultrakurze Laserquellen verwendet. Eine der am meisten verwendeten Laserquellen ist ein sogenannter Titan:Saphir-Laser [Moulton, 1986; Spence, Kean und Sibbett, 1991], kurz Ti:Sa-Laser. Zu dieser Laserklasse gehört z.B. der hier verwendete Mira 900 (Coherent, Dieburg).

Mira 900

Ein Ti:Sa-Laser besitzt einen Titan:Saphir ($\text{Ti}^{3+}:\text{Al}_2\text{O}_3$)-Kristall als aktives Lasermedium (siehe 2.2). Ein Korund (Al_2O_3)-Kristall wird dafür mit Titan-Ionen dotiert, die für

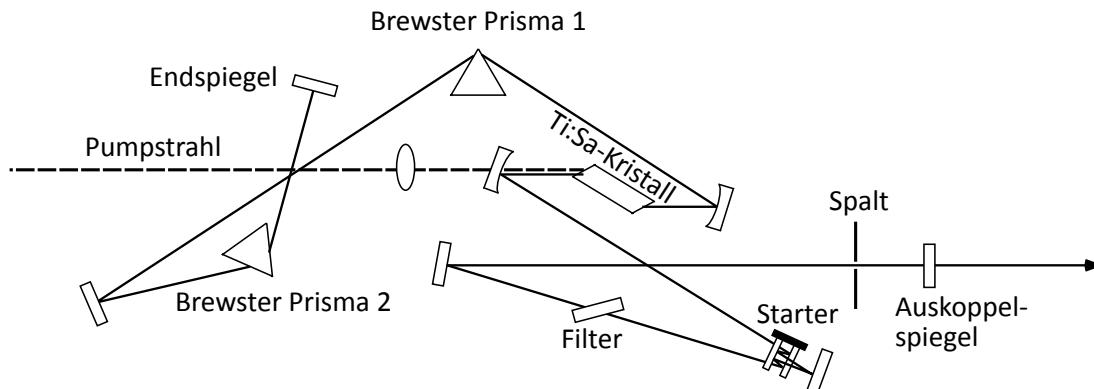


Abbildung 2.2 Strahlengang eines Mira 900 nach Handbuch Mira

die Fluoreszenz des Kristalls verantwortlich sind. Durch die breite Fluoreszenzbande des Ti:Sa-Kristalls von 670–1070 nm ergibt sich ein relativ großer durchstimmbarer Bereich. Beim Mira 900 ist der Bereich abhängig von der eingebauten Optik und der Betriebsart, hier reicht der Bereich zum Durchstimmen der Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 770\text{--}810\text{ nm}$. Die Zentralwellenlänge kann mit Hilfe des doppelbrechenden Filters (siehe Abbildung 2.2) ausgewählt werden. Die maximale Ausgangsleitung von ca. 600 mW erhält man bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 800\text{ nm}$. Der Strahl im Resonator wird mit Hilfe

einer Kerr-Linse (Ti:Sa-Kristall) auf den Spalt fokussiert und damit modengekoppelt. Der Starter erzeugt zufällige Fluktuationen der Moden. Bei erfolgreicher Modenkopplung besitzt der Strahl die höchste Intensität. Durch den intensitätsabhängigen Brechungindex in der Kerr-Linse entsteht eine Selbsfokussierung des Strahls, der dann den Spalt passieren kann, am Auskoppelspiegel reflektiert und somit verstärkt wird. In dem Laserresonator sind zusätzlich zwei Brewster Prismen eingebaut, mit deren Hilfe sich die **GVD** und somit die Pulsdauer einstellen lässt. Als Pump laser wurde ein Argon-Ionen-Laser (Innova 400; Coherent GmbH, Dieburg) im Multilinebetrieb bei einer Hauptwellenlänge von 514,5 nm, bzw. 545,6 nm und einer Pumpleistung von 7-8 W verwendet.

Spezifikationen:	Pumpleistung 8.0 Watt @ Multiline		
mittlere Ausgangsleistung	500 mW	Wellenlängenbereich	770-810 nm
Breite der Autokorrelation	200 fs	Strahldurchmesser	$(0,8 \pm 0,2)$ mm
Spitzenleistung (berechnet mit sech^2 Profil)	50 kW	Divergenz (ganzer Winkel)	$(1,5 \pm 0,2)$ mrad
Störsignal (RMS)	<2,0%	Polarisation	Horizontal
Mode:	TEM ₀₀	Repetitionsrate	76 MHz

Tabelle 2.1 Spezifikationen Mira 900 aus Handbuch Mira

femtoTRAIN™ Yb

Der *femtoTRAIN™ Yb* Laser (High Q Laser GmbH, Rankweil) ist ebenfalls wie der Ti:Sa-Laser ein Festkörperlaser, der als aktives Medium einen Ytterbium(Yb) dotierten Kristall besitzt. Die Modenkopplung wird über einen sättigbaren absorbierenden Spiegel aus Halbleitermaterial (semiconductor saturable absorber mirror=SESAM) gewährleistet. Dafür werden speziell beschichtete Spiegel verwendet, die eine intensitätsabhängige Absorption besitzen. Mit zunehmender Intensität steigt die Reflektivität des Spiegels und verstärkt damit nur den modengekoppelten Laserstrahl. Als Pumpquelle wird eine Laserdiode verwendet.

Spezifikationen:			
mittlere Ausgangsleistung	2,75 W	Wellenlänge	1040 nm
Breite der Autokorrelation	$250 \text{ fs} \pm 50 \text{ fs}$	Strahldurchmesser	$(0,60 \pm 0,06)$ mm
Spitzenleistung	400 kW	Divergenz	$(2,2 \pm 0,2)$ mrad
Störsignal (RMS)	<1,0%	Polarisation	Horizontal
Mode:	TEM_{00} $M^2 \leq 1.2$	Repetitionsrate	21 MHz

Tabelle 2.2 Spezifikationen *femtoTRAIN™ Yb*

2.2.2 Laserquellen zur Justage und konfokalen Detektion

Zur erleichterten Justage des Aufbaus mit sichtbaren Laserlicht sowie zur Aufnahme von Epifluoreszenz- und konfokalen Bildern wurde ein schmalbandiger frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (LCM-T-llccs, Laser2000; Wessling) mit einer Ausgangsleistung von 10 mW

und bei einer Wellenlänge von 532 nm verwendet. Die Grobjustage des Gitterkompressors wurde mit einer Laserdiode ($\lambda = 808$ nm, 80 mW, Roithner Laser Technik; Wien) durchgeführt.

2.3 Scannerkopf

Die Abrasterung des Faserbündels wurde mit dem Yanus II Laserscanner (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) durchgeführt. Der Laserscanner (siehe Abbildung 2.3) basiert auf zwei

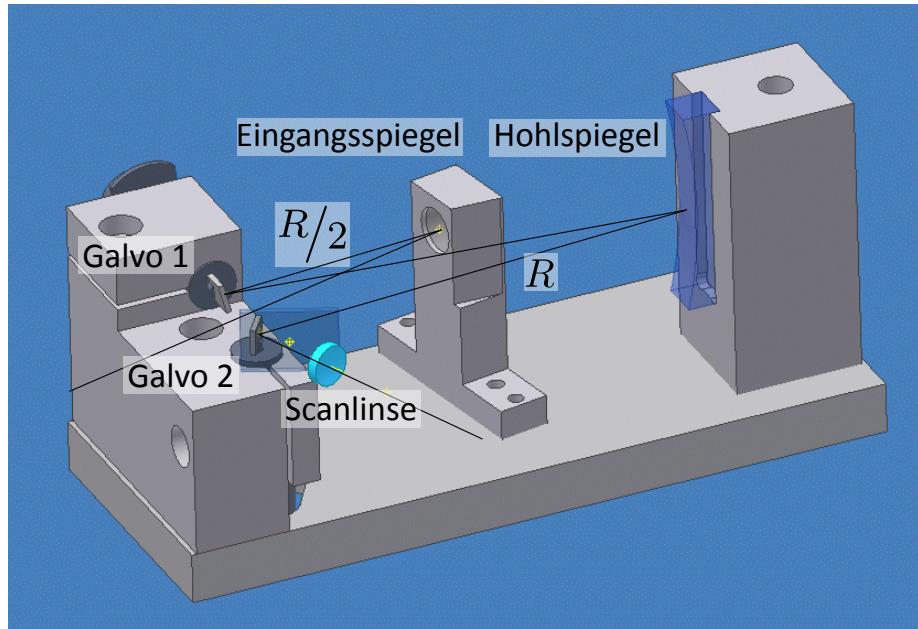


Abbildung 2.3 Aufbau Yanus-Scanner

galvanometrisch angetriebenen Spiegeln (kurz Galvo, CTI 6210; Cambridge Technology, Lexington, Massachusetts), die eine Bewegung in x- und y- Richtung realisieren. Das Besondere dieses Laserscanners ist, dass nicht mit Linsen sondern mit Hohlspiegeln gearbeitet wird. Um die Scannerbewegung des ersten Scannerspiegels auf den zweiten Scannerspiegel abzubilden wurde ein großer Hohlspiegel verwendet. Das Zentrum des Krümmungsradius R ist der zweite Scannerspiegel. Durch den Krümmungsradius entsteht eine Fokussierung mit der Brennweite $R/2$ des parallel eingehenden Laserstrahls. Da beim Eintritt in das Mikroskopobjektiv ein paralleler Laserstrahl benötigt wird, ist in dem Scannerkopf ein zweiter Hohlspiegel als Eingangsspiegel eingebaut. Der Eingangsspiegel befindet sich vor dem ersten Scannerspiegel. Die Brennweite wurde so gewählt, dass sich der Fokuspunkt im Abstand R zu dem Eingangsspiegel ergibt. Der Durchmesser des Eingangslaserstrahls wird damit um einen Faktor zwei verkleinert. Durch das spezielle Design des Scannerkopfs ist es möglich, dass der Strahl auf dem zweiten Galvospiegel nur einen Drehpunkt besitzt, an dem die Ablenkung in x- und y-Richtung verstellt werden kann. Bei anderen Scannern existieren zwei unterschiedliche Drehpunkte für die x- und y- Richtung. Ein Galvospiegel kann eine mechanische Drehung von $\pm 15^\circ$ realisieren. Zum Schutz der galvanometrischen Motoren werden nur Winkel bis $\pm 11^\circ$ verwendet.

Dies entspricht einem optischen Winkel von $\pm 22^\circ$. Die Kommunikation mit den Galvos ist über eine RS232-Schnittstelle realisiert. Auf diese Schnittstelle greift die LabVIEW basierte Scan-Software „Colibri“ (siehe <http://www.lrz.de/~chr/>, Aufruf 28.08.2012) zu und steuert damit die Galvos an. Die Bilderfassung wird in Kapitel 2.7 erläutert.

2.4 Einkoppeloptik

Die Fokussierung des Laserstrahls auf das Faserbündel wurde mit Hilfe eines Linsensystems aus zwei Linsen und einem Mikroskopobjektiv realisiert (siehe Abbildung 2.4). Das Mikroskopobjektiv wurde verwendet, um eine ausreichend gute Fokussierung des Laserstrahls auf einen Durchmesser der einzelnen Faserkerne von $3,5 \mu\text{m}$ zu gewährleisten. Der Drehpunkt des zweiten Galvospiegels wird dabei telezentrisch auf die Eingangsfläche des Faserbündels abgebildet. Da durch den Scannerkopf der Laserstrahl um einen Faktor

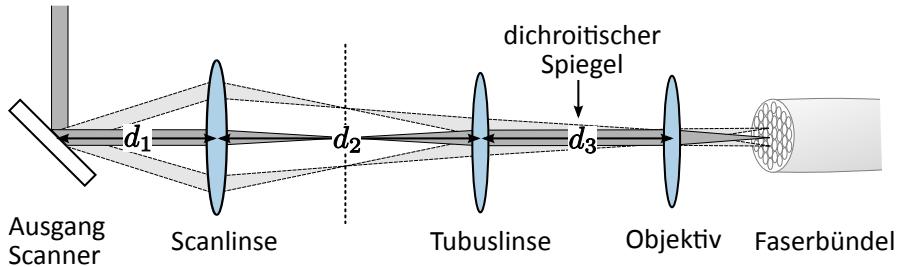


Abbildung 2.4 Linsensystem zur Einkopplung in das Faserbündel

zwei verkleinert wird und der Eingangsstrahl in den Scannerkopf auf einen Durchmesser von ca. 3,5 mm limitiert ist, wurde das Linsensystem so konzipiert, dass eine Vergrößerung des Laserstrahldurchmessers realisiert wird. Die Vergrößerung muss dabei so gewählt werden, dass die Apertur des Mikroskopobjektiv ausgefüllt ist. Das wird mit Hilfe des Füllparameters c angegeben:

$$c = \frac{D_{beam}}{D_{BA}} \quad (2.1)$$

Hier ist D_{beam} der Durchmesser des Laserstrahls am Ausgang des Scannerkopfs und D_{BA} die Objektiv-Apertur (Back-Apertur). Der Füllparameter sollte optimalerweise einen Wert >1 haben. Das Mikroskopobjektiv besitzt eine Eingangsapertur (Back-Apertur) D_{BA} von 4 mm bei einer Vergrößerung von 20x und einer numerischen Apertur von 0.4. Durch die verschiedenen Elemente und die damit verbundene Wegstrecke im Strahlengang bis zum Scannereingang ist der anfängliche Strahldurchmesser des Ti:Sa-Lasers auf ca. 3 mm aufgeweitet. Damit ergibt sich ein Strahldurchmesser von 1,5 mm nach dem Scannerkopf. Die Objektiv-Apertur besitzt einen Durchmesser von 4 mm. Damit ist eine Vergrößerung von etwa $M = 3$ anzustreben.

Der Laserstrahl wird durch die Scanlinse f_{scan} und die Tubuslinse f_{tub} mit Hilfe des Objektivs auf das Faserbündel fokussiert. Die Scanlinse und die Tubuslinse sind als Strahllaufweiter, d.h. als Teleskop aufgebaut, woraus sich der Abstand d_2 zwischen den Linsen als $f_{scan} + f_{tub}$ ergibt:

$$d_2 = f_{scan} + f_{tub} \quad (2.2)$$

Damit der Drehpunkt des Scannerkopfs auf das Faserbündel abgebildet wird und das Objektiv immer gleich ausgefüllt ist (telezentrische Abbildung), gilt für den Abstand d_1 folgende Relation [Tsai u. a., 2009]:

$$d_1 = \frac{(f_{\text{scan}})^2}{f_{\text{tub}}} + f_{\text{scan}} - d_3 \left(\frac{f_{\text{scan}}}{f_{\text{tub}}} \right)^2 \quad (2.3)$$

Hier wurde der Fall realisiert, bei dem der Drehpunkt auf dem zweiten Scanerspiegel im Fokus der Scanlinse, $d_1 = f_{\text{scan}}$, und die Objektiv-Apertur des Objektivs im Fokus der Tubuslinse, $d_3 = f_{\text{tub}}$ steht. Anfangs wurden vorhandene Achromaten der Marke Linos (Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen) verwendet. Die Brennweite der Scanlinse betrug 30 mm bei einem Durchmesser von 12,5 mm und die Brennweite der Tubuslinse 100 mm bei einem Durchmesser von 18 mm. Daraus resultiert eine Vergrößerung von $M = 3,3$ und ein Füllungsparameter von ca. $c = 1,25$. Aufgrund des eingeschränkten Durchmessers der Linsen entstanden vor allem an den Randbereichen des Faserbündels Verzerrungen. Im Nahinfrarotbereich führte dies an den Randbereichen zu einer ineffizienteren Einkopplung in das Faserbündel mit einem größeren Durchmesser (IGN08/30) (siehe Kapitel 3.1.1). Um die Einkopplung zu optimieren, wurde das Linsensystem durch Linsen der Firma Edmund Optics (Karlsruhe) ersetzt. Bei der Auswahl der Linsen wurde auf verschiedene Kriterien geachtet: Viele Mikroskopobjektive sind auf eine Tubuslinse mit einer Brennweite von 180–200 mm optimiert. Daher wurde als Tubuslinse eine Linse mit $f_{\text{tub}} = 200$ mm gewählt. Zum einen wird für die Fasereinkopplung eine möglichst gute Abbildungsqualität und zum anderen eine gute Transmission der Linsen für einen großen Wellenlängenbereich 400–1000 nm gewünscht. Somit standen als mögliche Linsen Achromaten mit einer speziellen Beschichtung (VIS-NIR siehe Abbildung A.2) der Firma Edmund Optics (Karlsruhe) mit einem Durchmesser von 25 mm zur Verfügung. Aus den erhältlichen Linsen wurde als Scanlinse eine Linse (49357INK) mit der Brennweite $f_{\text{scan}} = 60$ mm und als Tubuslinse eine Linse (49364INK) mit der Brennweite $f_{\text{tub}} = 200$ mm ausgewählt. Damit ergibt sich eine Vergrößerung von $M = 3,3$ und ein Füllungsparameter $c = 1,25$. Beide Linsensysteme wurden mit Hilfe einer Optiksimulation (Zemax, Optima Research; Stansted) miteinander verglichen. Dabei wurden die Kriterien aus diesem Kapitel berücksichtigt. Da die Zemaxdaten des Mikroskopobjektivs nicht bekannt sind, wurde in der Simulation eine paraxiale Linse mit einer Brennweite von 10 mm verwendet.

2.5 Lichtwellenleiter

Als Lichtwellenleiter wurden verschiedene Glasfasern und Glasfaserbündel genutzt. Die wesentlichen Eigenschaften der Glasfasern sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Da Monomodefasern definierte Eigenschaften besitzen, wurde zur Überprüfung einiger Experimente eine Monomodefaser (780-HP, Thorlabs GmbH; Dachau) mit einem Modenfelddurchmesser von 5 μm (bei $\lambda = 850$ nm) und einer numerischen Apertur von 0,13 verwendet (siehe Abbildung 2.5 (a)). Bei den Glasfaserbündeln wurden zweierlei Typen getestet: Zwei-Glas-Faserbündel der Firma Sumitomo (Sumitomo Electric Industries, Ltd., Tokyo) und Drei-Glas-Faserbündel der Firma KARL STORZ GmbH & Co. KG

Typ	Bild- elemente	\varnothing [μm]	\varnothing Kern [μm]	Faserkernabstand [μm]	NA	Fläche [mm^2]	Packungs- dichte [μm^{-2}]
Monomodefaser							
780-HP Messung	1	-	4,4 4,1 \pm 0,5	-	0,13	-	-
Zwei-Glas-Faserbündel							
IGN 08/30	30 000	720	3,5		0,35	0,41	0,074
IGN 06/17 Messung	17 000	540		2,5 \pm 0,5	0,35	0,23	0,074
IGN 035/06 Messung	6000	315		2,3 \pm 0,5	0,35	0,08	0,077
Drei-Glas-Faserbündel							
Karl Storz Messung	18 056	900 950 \pm 5	3,5 3,5 \pm 0,3	7,0 7,0 \pm 0,3	0,45	0,64	0,028

Tabelle 2.3 Fasern; \varnothing gibt den Durchmesser der aktiven Fläche des Faserbündels an; Die Fläche ist aus dem aktiven Durchmesser berechnet. Die Packungsdichte ist die Anzahl der Bildelemente durch die Fläche.

(KST, Tuttlingen, Herstellung Charlton).

Zwei-Glas-Faserbündel

Die Glasfaserbündel der Firma Sumitomo (IGN 20/50, 08/30, 06/17, 035/17) bestehen aus zwei Glaskomponenten und werden mit der Zweiglastechnologie hergestellt. Dabei werden Bündel von Glasstäben aus zwei Komponenten erhitzt und in die Länge gezogen. Damit entstehen einzelne Kerne, die von einem niedrig brechenderen Glasmaterial umgeben sind. Das Bündel ist mit einem zusätzlichen Mantel aus dem Mantelmaterial und einer Schutzhülle aus schwarzem Silikon umgeben. Da diese Faserbündel aus zwei Glaskomponenten bestehen, werden sie im Folgenden Zwei-Glas-Faserbündel genannt (siehe Abbildung 2.5 (b)). Das Material dieser Faserbündel basiert auf Quarzglas. Das Material der Faserkerne wird mit Germaniumdioxid dotiert, der Mantel besteht aus reinem reinem Quarzglas (IGN 20/50) oder mit Fluorine dotierten Quarzglas (IGN 08/30, 06/17, 035/17). Genaue Angaben zum Brechungsindex des Faserkerns sind allerdings nicht bekannt.

Drei-Glas-Faserbündel

Weiterhin wurden noch Glasfaserbündel aus drei Glaskomponenten (Drei-Glas-Faserbündel) verwendet, bei denen durch das nachträgliche Herausätzen der dritten Glaskomponente einzelne kohärente Fasern aus einem Kern und einem Mantel entstehen (siehe Abbildung 2.5 (c)). Diese Fasern wurden von der Firma KST zur Verfügung gestellt. Angaben zum Faserkernmaterial wurden aus Vertraulichkeitsgründen nicht an uns weitergegeben.

Einige Angaben der Faserbündel wurden zusätzlich noch anhand von mikroskopischen Auflichtaufnahmen verifiziert bzw. vervollständigt. Dazu wurden mit einer 20x Vergrößerung (Leica DM IRBE, Wetzlar, NA=0,5) mikroskopische Bilder aufgenommen,

der Maßstab mit einem Objektmikrometer (Leica) kalibriert und anhand eines Linienprofils über die Faserkerne der Abstand und die Durchmesser der Faserkerne mit Hilfe von ImageJ bestimmt. Der aktive Durchmesser wurde bei einer 10x Vergrößerung ($NA=0,3$) ebenfalls mit Hilfe von ImageJ ausgemessen.

Der Vorteil der Drei-Glas-Faserbündel gegenüber den Zwei-Glas-Faserbündeln ist die hohe Flexibilität, ein geringeres Übersprechen zwischen benachbarten Fasern und der regelmäßige Kerndurchmesser. Der Nachteil ist der größere Abstand zwischen den einzelnen Kernen und damit die wenigeren Bildpunkte (Pixel) pro Durchmesser.

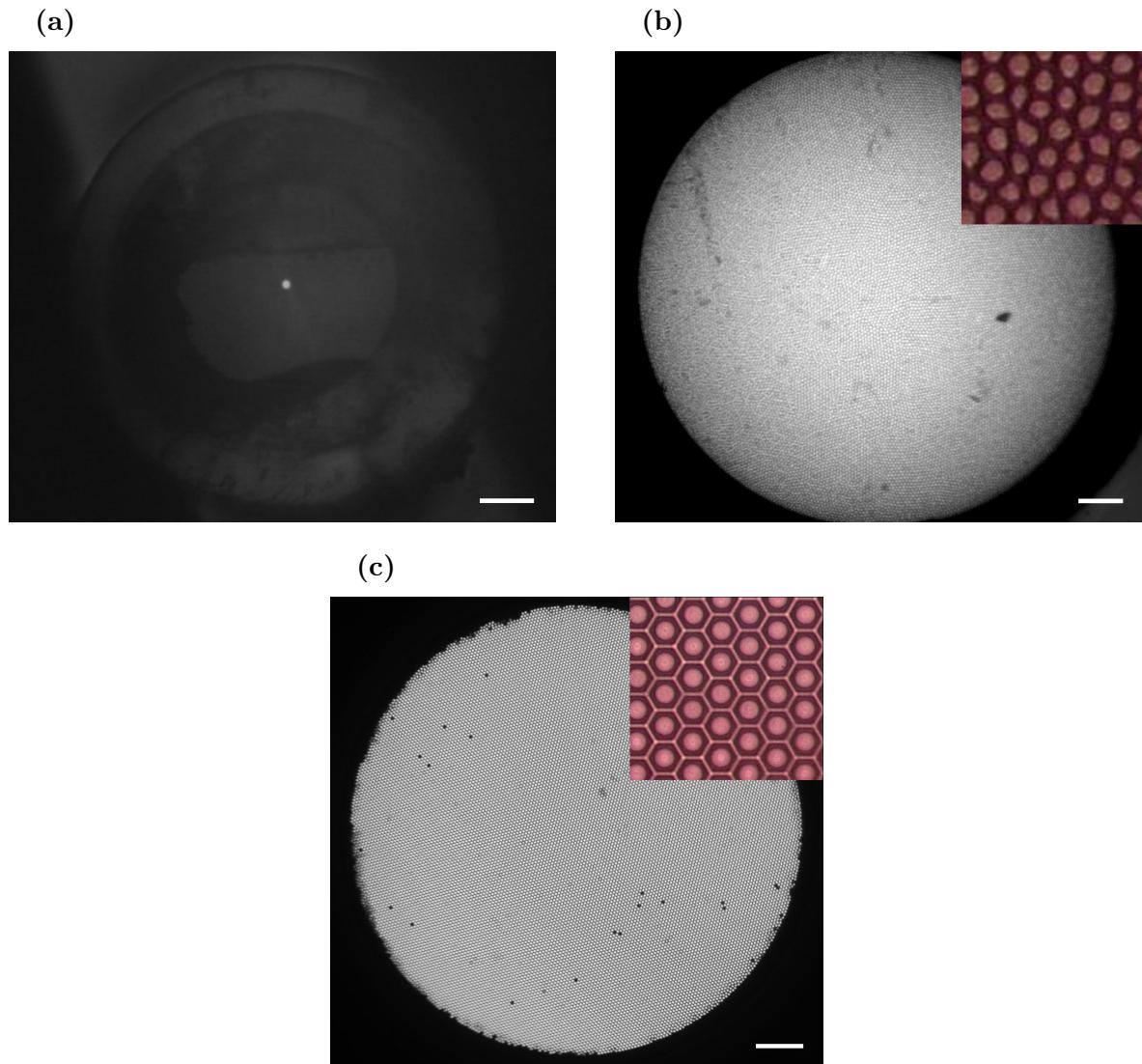


Abbildung 2.5 Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Lichtwellenleiter (Leica DM IRBE): (a) Monomodefaser mit einer NA von 0,5, Maßstab 30 μm (b) Zwei-Glas-Faserbündel (IGN 06/17) mit einer NA von 0,5. Rechts oben ist vergrößert die Faserstruktur eingeblendet; Maßstab 50 μm (c) Drei-Glas-Faserbündel mit einer NA von 0,3. Rechts oben ist vergrößert die Faserstruktur eingeblendet; Maßstab 100 μm

2.6 Distale Optik

Am Ende des Faserbündels wurde ein abbildendes Linsensystem verwendet, um die Abbildungsqualität des Systems zu verbessern (siehe 2.6.3) und eine Abbildung in tieferen Gewebebeschichten zu ermöglichen, da ohne eine distale Optik nur bei direktem Kontakt des Objektes mit der Faser Bilder erzeugt werden können.

2.6.1 Mikrooptik

In Zusammenarbeit mit Karl Storz wurde eine Mikrooptik entwickelt (siehe Abbildung 2.6). Die Mikrooptik besitzt einen Außendurchmesser von unter 3 mm mit einem Arbeitsabstand von ca. 570 μm . Die Numerische Apertur ist objektseitig ca. 0,6. Der Vergrößerungsfaktor ist $M_{distaleOptik} = 2$. Bedingt durch die Eingangsgröße der Fassung, wurde hier ein Faserbündel (IGN 035/06) mit einem kleineren Außendurchmesser verwendet. Dabei wurde ein Faserbündel verwendet, das einen vergleichbaren Faserkerndurchmesser und -abstand besitzt.

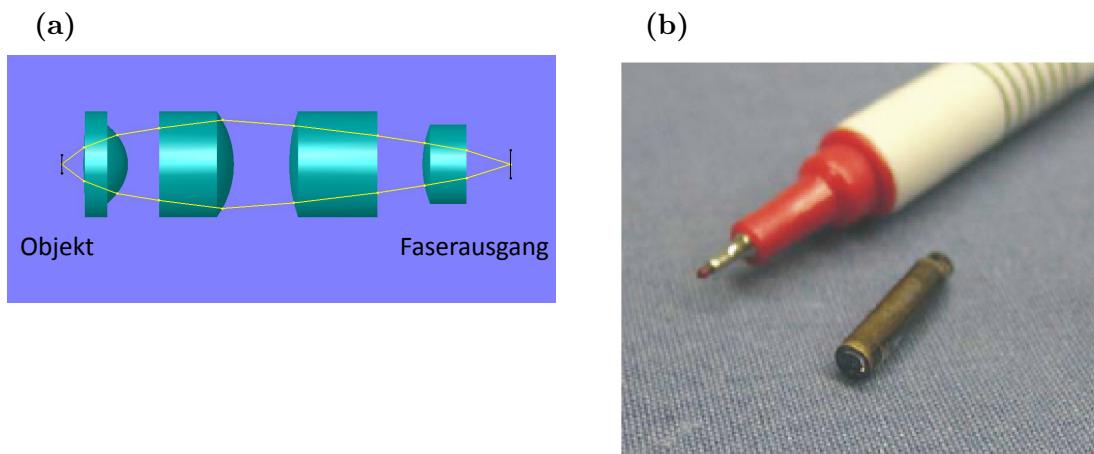


Abbildung 2.6 Mikrooptik von KST (a) Schematischer Aufbau der Mikrooptik von KST (b) Real

2.6.2 Referenzsystem

Als Vergleich zur Mikrooptik wurde aus zwei Mikroskopobjektiven ein Referenzsystem aufgebaut. Dabei wurde ein Objektiv (10x, NA = 0,25) zur Kollimation des Lichts aus den einzelnen Fasern verwendet und mit Hilfe eines weiteren Objektivs das Licht auf die Probe fokussiert. Zur Variation der objektseitigen NA wurde zum einen ein 20x Objektiv (NA 0,5) und zum anderen ein 40x Objektiv (NA = 0,75) verwendet. Das Objektiv für die Kollimation wurde nicht ersetzt. Damit kann eine distale Vergrößerung $M_{distaleOptik}$ von 2 (NA = 0,5) bzw. 3 (NA = 0,75) erreicht werden. Standardmäßig wurde als Referenzsystem die Kombination der Objektive 10x bei einer NA von 0,25 und 40x bei einer NA von 0,75 verwendet.

2.6.3 Auflösung

Die Auflösung des Systems ist durch die laterale und die axiale Auflösung gegeben. Durch die Verwendung von Faserbündel wird die laterale Auflösung durch den Abstand zwischen den einzelnen Faserkernen begrenzt, da der Faserkernabstand ($>2\text{ }\mu\text{m}$) in der Regel größer ist als die laterale Auflösung eines Mikroskopobjektivs. Die laterale Auflösung δr ist zusätzlich noch von der distalen Optik abhängig, da der Faserkernabstand über die dort realisierte Vergrößerung $M_{distaleOptik}$ am Objekt verkleinert wird. Durch die hexagonale Packung der einzelnen Faserkerne ist der „effektive“ Faserkernabstand, der die laterale Auflösung bestimmt, kleiner als der reale Faserkernabstand. Zur Unterscheidung von zwei Punkten ist jedoch aufgrund des Abtasttheorems der doppelte „effektive“ Faserkernabstand notwendig. Damit ergibt sich für die laterale Auflösung:

$$\delta r = \sqrt{3} \frac{\text{Faserkernabstand}}{M_{distaleOptik}} \quad (2.4)$$

Die Vergrößerung der distalen Optik ist über die NA der beiden Linsen gegeben. Zur Überprüfung wurde die Vergrößerung gemessen, indem Objekte bekannter Größe (FokalCheck $15\text{ }\mu\text{m}$, Life Technologies; Pollengrains, Carolina; Burlington) vermessen wurden. Durch den bekannten Faserdurchmesser kann damit die Vergrößerung bestimmt werden. Da die laterale Auflösung wesentlich durch den Faserkernabstand bestimmt wird, ist die laterale Auflösung in erster Näherung unabhängig von der Wellenlänge.

Zur Messung der axialen-Auflösung wurde eine dünne fluoreszierende Schicht entlang der z-Achse mit Hilfe eines Piezomotors (Closed Loop Picomotors Model 8310, Firma New Focus, USA) verstellt. Der Motor besitzt einen closed-loop Controller, womit eine absolute Positionierungsgenauigkeit von 30 nm erreicht wird. Der maximale lineare Verstellungsweg ist $12,7\text{ mm}$. Die Schraube hält eine maximale Kraft von 22 N längs der Achse aus. Die Reproduzierbarkeit des Picomotors wurde in der Diplomarbeit von Oleksandr Lykhvar am LFL überprüft. Die fluoreszierende Schicht wurde hergestellt, indem eine $0,5\text{ M}$ Fluoreszeinlösung auf Wasserbasis hergestellt wurde und diese im Verhältnis 1:5 mit Aquatex (Merck, Darmstadt) verdünnt wurde. $5\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung wurden auf einen Objektträger getropft und mit einem $25\times25\text{ mm}$ Deckglas getrocknet. Die Dicke der Schicht wurde mit dem Konfokalmikroskop als unter $2\text{ }\mu\text{m}$ gemessen.

2.7 Fluoreszenzlichtdetektion und Bilderfassung

Das Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers (Multiphoton Langpass-Strahlenteiler HC 775 LP, AHF analysentechnik AG; Tübingen, Hersteller Semrock), im parallelen Strahlengang der Einkoppeloptik von dem Anregungslight getrennt (Abbildung 2.4). Das reflektierte Fluoreszenzlicht ist divergent und wurde mit Hilfe einer Linse auf die aktive Fläche eines Photomultipliers (H5784, Datenblatt siehe A.3) fokussiert. Zur Unterdrückung des Anregungslights wurde kurz vor dem PMT ein Multiphoton-Emitter (HC 770/SP, AHF analysentechnik AG; Tübingen, Hersteller Semrock) integriert. Der H5784 ist ein Photosensor-Modul, das den Strom eines integrierten PMT in eine Spannung umwandelt und für eine leichtere Signalverarbeitung verstärkt. Das Photosensor-Modul wurde an eine

selbstgebaute ± 15 V Spannungsversorgung angeschlossen. Der Verstärkungsfaktur kann wahlweise über einen Dreh-Potentiometer oder aus dem Scanprogramm „Colibri“ über das Multifunktions-Datenerfassungsmodul (NI-PCI-6111) eingestellt werden. Bei der Fluoreszenzlichtdetektion ist darauf zu achten, dass Störsignale aus der Umgebung (z.B. Raumlicht, Bildschirm) möglichst abgeschirmt sind. Das Spannungssignal des PMT wird bei jeder Position der Scannerspiegel mit dem Scanprogramm „Colibri“ eingelesen. Die Spannungswerte werden Grauwerten zugeordnet und in Echtzeit an der entsprechenden Bildposition angezeigt. Der Bildaufbau ist abhängig von der Geschwindigkeit der Scannerspiegel. Der Scanner besitzt zwei Ausgänge zur Synchronisation der Scannerbewegung mit der Aufnahme der einzelnen Bildpunkte (Pixel), ein Triggersignal (8 MHz) mit dessen Hilfe die Pixelclock (abhängig von der gewünschten Anzahl der Pixel) bestimmt wird und ein Triggersignal, das den Bildanfang signalisiert. Mit dem zweiten Triggersignal kann eine Verzögerung realisiert werden, mit der die Galvospiegel die Bewegung starten („Smartmove Zeit“). Diese Information ist für einen bidirektionalen Scan notwendig. Die Synchronisation, die Aufnahme der Bildpunkte sowie die Ansteuerung bzw. Aufnahme weiterer optionaler Komponenten (z.B. Steuerung der Verstärkung des PMT) erfolgt über eine Multifunktions-Datenerfassungsmodul (NI-PCI-6111) von National Instruments (Austin, Texas). Die Berechnung der Bilder erfolgt ebenfalls in dem Scanprogramm „Colibri“. Die Größe, die Position, die Geschwindigkeit des Scans und die Anzahl der Pixel oder die Pixelgröße werden ebenfalls in dem Scanprogramm festgelegt. Die Pixelgröße bezeichnet im Folgenden die Größe der abgescannten Fläche in der Probe geteilt durch die Anzahl der Pixel. Die in dem Scanprogramm „Colibri“ angegebenen Einheiten (z.B. Pixelgröße von 1 μ) beziehen sich auf das Zwischenbild (siehe Abbildung 2.4), bei einer Scanlinse mit einer Brennweite von 35 mm. Diese Angaben wurden experimentell in einen Maßstab, der die Größe eines Pixels in Bezug auf die tatsächliche Objektgröße angibt, umgerechnet. Die abgespeicherten Bilder wurden später mit ImageJ ausgewertet. Durch die einzelnen Fasernkerne des Faserbündels entsteht eine Struktur, die mit einem Gaußfilter homogenisiert wurde.

2.8 Pulskompressor

Die Funktionsweise der Kompressoren wurde in Kapitel 1.3.5 vorgestellt. Um die in einem Faserbündel auftretenden Dispersionseffekte (GVD) zu kompensieren, wurden die verschiedenen Möglichkeiten unter praktischen Aspekten evaluiert (siehe Tabelle 2.4). Das Ziel war es, eine Methode auszusuchen, die eine gute Handhabung besitzt, wenig Platz benötigt und dabei eine hohe Effizienz aufweist. Effizienz definiert in diesem Zusammenhang das Verhältnis von ausgestrahlter zu eingestrahlter Laserleistung. Zusätzlich wurde noch der Dispersionsumfang innerhalb einer Konfiguration bewertet, da ein möglichst flexibler Einstellbereich der Dispersion erreicht werden sollte. Als letzter Punkt wurde noch die Dispersionskompensation berücksichtigt, d.h. die Kompensation aller Ordnungen der Dispersion (GDD und TOD). In Bezug auf die Handhabung sind Prismen am besten geeignet, da diese relativ unempfindlich gegen Kratzer und leicht zu reinigen sind. Die Handhabung von Gitter ist dagegen aufwendig, da die empfindliche Oberfläche anfällig für Staub und ölhaltigen Schmutz ist. Mit Gitter und Grism kann durch eine kleine Variation des Abstandes der Umfang der Dispersionskompensation

verändert werden, ohne dass ein Umbau der Komponenten nötig ist. Da Prismen weniger dispersiv als Gitter sind, muss bei einer Kompensation einer großen Glassstrecke der Abstand zwischen den Prismen größer als mit Gittern gewählt werden. Der Platzbedarf für einen Aufbau eines Prismenkompressors ist somit sehr viel höher als mit Gittern. In Bezug auf die Effizienz sind Prismen am besten geeignet, da diese im Brewster Winkel eine minimale Reflexion und somit eine hohe Effizienz aufweisen. Insgesamt kann damit ein Prismenkompressor eine Effizienz von $> 90\%$ erreichen. Die Effizienz eines Gitters hängt stark von der Gitterkonstante sowie der Wellenlänge ab und ist verglichen mit der Effizienz eines Prismas in der Regel geringer. Da bei einem typischen Kompressorlaufbau (siehe Abbildung 1.10) vier Elemente notwendig sind, muss die Effizienz eines einzelnen Gitters hoch vier genommen werden. Geringe Effizienzunterschiede eines einzelnen Elementes können damit eine große Auswirkung auf die Gesamteffizienz des Kompressors haben. Gerade bei Gittern mit einer hohen Effizienz ($>80\%$) gibt es ein wellenlängenabhängiges Maximum, dass für verschiedene Gitterkonstanten bei einer anderen Wellenlänge liegt. Das Effizienzmaximum ist z.B. für 800 nm bei ca. 1200 Linien/mm. Die Funktionsweise gechirpter Spiegel unterscheidet sich von der Funktionsweise eines vier Elemente-Kompressors, da bei gechirpten Spiegeln Dispersionseffekte pro Reflexion entstehen. Über die Anzahl der Reflexionen zwischen zwei Spiegeln kann der Betrag der GDD und TOD gesteuert werden. Die Reflektivität eines gechirpten Spiegels ist meistens sehr hoch. Allerdings ist der Betrag der GDD pro Reflexion bei kommerziell erhältlichen gechirpten Spiegeln relativ klein (ca. -175 fs, damit sind bis zu 200 Reflexionen notwendig um z.B. einen Meter Faserstrecke zu kompensieren. Selbst bei einer Effizienz von 99,8% pro Reflexion ist damit die Gesamteffizienz $<70\%$. Zudem ist die Spiegelfläche zu klein, um nur mit zwei Spiegeln arbeiten zu können. Bei der Auflistung aller Vor- und Nachteile stellte sich daher heraus, dass Gitter oder Grism den Prismen leicht vorzuziehen sind, vor allem wegen des hohen Platzbedarfs des Prismenkompressors. Problematisch dabei ist auch eine Vergrößerung des Laserstrahls nach dem ersten Prisma. Das zweite Prisma müsste sehr groß gewählt werden, damit der gesamte Laserstrahl auf das zweite Prisma trifft. Insgesamt sind leichte Vorteile von Grism gegenüber Gittern zu erwarten, hauptsächlich da die TOD besser kompensiert werden kann. Grisms waren zur Zeit des Kompressorbaus kommerziell nicht verfügbar. Letztendlich wurde daher

Typ	Handhabung	Dispersionsumfang	Dispersionskompensation	Platz	Effizienz
Prismen	++	+	+	-	++
Gitter	-	++	-	++	-
gechirpte Spiegel	+	-	++	+	+
Grism	+	++	+	++	-

Tabelle 2.4 Auflistung und Bewertung einiger Eigenschaften der einzelnen Kompressorarten

ein Aufbau mit zwei parallelen Gittern mit 600 Linien/mm (53004BK02-351R, Newport Spectra-Physics GmbH; Darmstadt) favorisiert und realisiert (siehe Abbildung 2.7). Über einen Linearversteller kann der Abstand der Gitter kontinuierlich variiert werden. Aus zwei rechtwinkligen spiegelnden Prismen (MRA25-P01, Thorlabs, Newton, New Jersey) wurde

ein Retroreflektor aufgebaut, der einen Höhenversatz zwischen dem eingehenden und dem ausgehenden Strahl realisiert. Über diesen Versatz konnte mit einem halbkreisförmigen Spiegel (Abgreifspiegel) der eingehende von dem ausgehenden Strahl getrennt werden. Bei

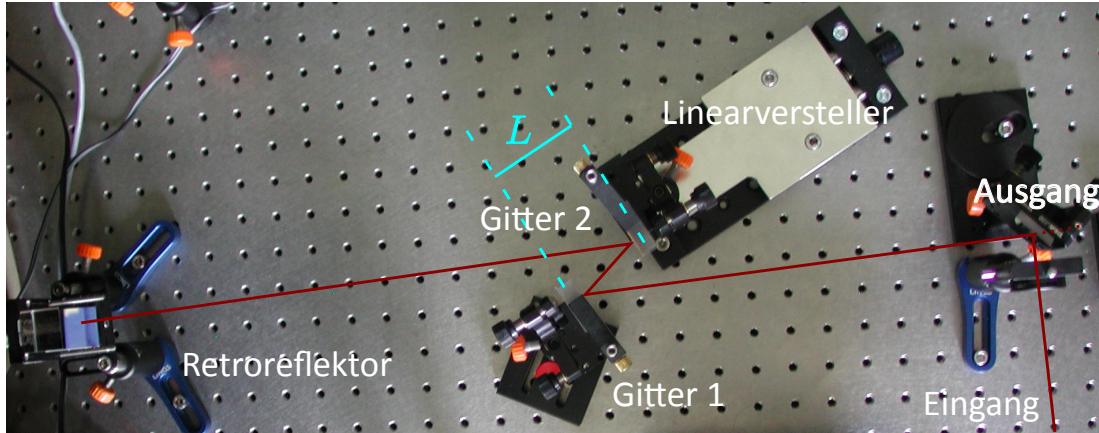


Abbildung 2.7 Aufbau Gitterkompressor

der Justage der Gitter ist der Einfallsinkel des Laserstrahls auf die Gitter entscheidend für die Effizienz des Kompressors. Eine Konfiguration nahe der Littrow-Anordnung ist zu favorisieren, da unter diesem Winkel die Gitter ein Effizienzmaximum aufweisen (siehe Datenblatt A.1). Laut Datenblatt ergibt sich für den Ti:Sa-Laser eine maximale Effizienz von 93% (S-Polarisation, bzw. horizontale Polarisation). Damit ist eine Gesamteffizienz von bis zu 75% möglich. Der Winkel der Gitter wurde nacheinander auf maximale Leistung optimiert. Die höchste Effizienz ergab sich bei einem Winkel von $14^\circ \pm 2^\circ$. Der Glanzwinkel ist laut Hersteller bei $13,88^\circ$. Durch eine Überlagerung von zwei verschiedenenfarbigen Laserdioden (532 nm, 808 nm, siehe Kapitel 2.2.2) wurde die Parallelität der Gitter überprüft, indem am Ausgang die Divergenz der beiden Laserstrahlen minimiert wurde. Durch die Optimierung mit Hilfe der beiden Laserdioden war im gepulsten Modus nur wenig Feinjustage notwendig.

2.9 Autokorrelator

Eine direkte Messung der Pulsdauer ist experimentell kaum zu realisieren, da die Antwortzeit von Photodioden aber auch von Oszilloskopen ($>200\text{ fs}$) im Vergleich zur Pulsdauer mit 100 fs zu lang ist. Daher wurde hier zur Messung der Pulsdauer ein Autokorrelator (Carpe, APE; Berlin) verwendet (siehe Abbildung 2.8). Generell basiert ein Autokorrelator auf einem Michelson-Interferometer, um den Eingangsstrahl mit Hilfe eines Strahlteilers in zwei Strahlen gleicher Intensität aufzutrennen und dann mit einer motorisierten Verstellung die Laufzeit eines Strahls zu verändern. Beide Strahlen werden wieder überlagert und auf einen Detektor fokussiert. In diesem Autokorrelator wird als Detektor eine Photodiode mit einer Bandlücke, die nur mit der Absorption von zwei Photonen gleichzeitig überwunden werden kann, verwendet. Damit kann die Intensitätsautokorrelation zweiter Ordnung gemessen werden. Das besondere an diesem Autokorrelator ist, das zusätzlich zu einem internen Detektor noch ein externer

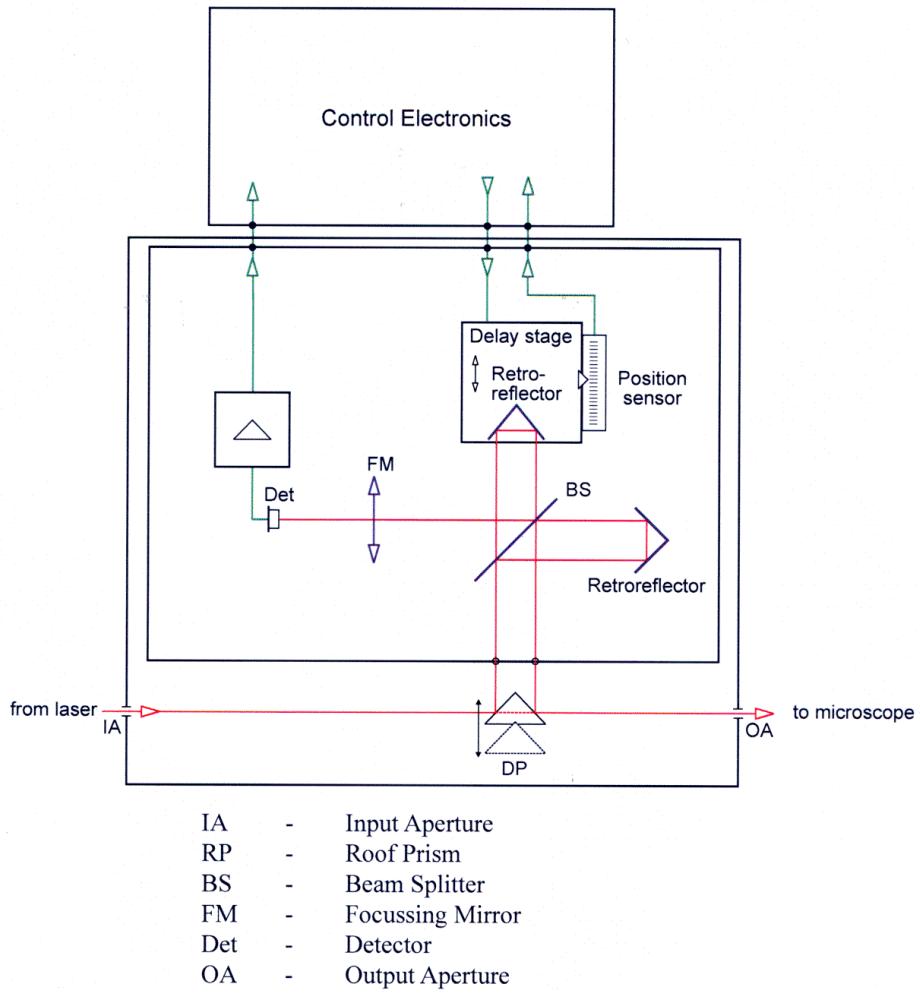


Abbildung 2.8 Strahlengang des Autokorrelators aus dem Handbuch von APE

Detektor verwendet werden kann, mit dem an einem beliebigen Ort im Strahlengang die Autokorrelation gemessen werden kann. Der Laserstrahl tritt über eine Eingangsapertur (Input Aperture) in den Autokorrelator ein. Ein verschiebbbares Prisma (Roof Prism) lenkt bei Aktivierung den Laserstrahl über die Komponenten des Autokorrelator. Im Fall der Verwendung des externen Detektors verlassen die überlagerten Strahlen den Autokorrelator über die Ausgangsapertur (Output Aperture) und können mit Hilfe einer Linse auf den externen Detektor fokussiert werden. Dadurch wird allerdings auch die mittlere Leistung auf höchstens die Hälfte reduziert. Durch den Leistungsverlust an Spiegeln und Optiken im Strahlengang des Autokorrelators ist eine Transmission von ca. 45% erreichbar. Für Pulse mit einem Gaußprofil ist die Breite der Autokorrelation um einen numerischen Faktor $\sqrt{2} = 1,41$ breiter als die tatsächliche Pulsbreite. Für Sech²-Profile beträgt der Faktor 1,54. Dieser Faktor ist damit abhängig von der Pulsform und wird auch als Dekonvolutionsfaktor bezeichnet.

2.10 Simulation

Die Ausbreitung der ultrakurzen Pulse wurde mit dem Programm $\mathcal{L}\mathcal{A}\mathcal{B}^{\text{II}}$ [Schmidt u.a., 2011] simuliert. Das Programm basiert auf der graphisch orientierten Programmiersprache LabVIEW (National Instruments) und bietet verschiedene Elemente, wie z.B. Laserquellen, verschiedene Kompressoren oder verschiedene lineare und nichtlineare Medien an. Zusätzlich existieren noch eine Vielzahl von Analysetool (z.B. Analyse der instantanen Frequenz, spektrale und zeitliche Phase) und Detektoren (z.B. Zeitbandbreiteprodukt (TWP), instantane Intensität, spektrale Intensität, Autokorrelator). Die wichtigsten Elemente werden kurz beschrieben:

Generate Gauss.vi

Diese Routine erstellt einen transformbegrenzten gaußförmigen Puls. Die Pulseigenschaften können entweder in der Frequenzdomäne oder in der Zeitdomäne angegeben werden. Neben der zentralen Wellenlänge λ_0 wird in der Zeitdomäne die Pulsdauer τ und in der Frequenzdomäne die spektrale Breite $\Delta\lambda$ angegeben. Zusätzlich müssen noch die Pulsenergie und der Strahldurchmesser festgelegt werden. Bei der Simulation von optischen Fasern wurde der Strahldurchmesser in den Fasern angegeben. Neben der Erstellung von gaußförmigen Pulsen gibt es noch die Möglichkeit, Sech²-förmige Pulse festzulegen. Reale Pulse können ein Profil zwischen einem Gauß und einem Sech²-Profil besitzen. Das für den Mira-900 im Datenblatt angegebene Profil ist ein Sech²-Profil. Allerdings liefert die Anpassung der gemessenen Autokorrelation mit einem Gaußprofil im Vergleich zu einem Sech²-Profil eine kleinere Summe aller Fehlerquadrate (siehe Kapitel 3.3.1). Durch die Ausbreitung von Pulsen mit einem Sech²-Profil in Fasern wird das Profil am Faserausgang tendenziell zu einem Gaußprofil.

Ideal Shaper.vi

Das Element erzeugt eine beliebige Funktion, die die spektrale Phase des Pulses verändert. Es besteht die Möglichkeit, direkt die Taylor-Koeffizienten der spektralen Phase einzugeben.

Grating Compressor.vi

Für dieses Element gibt es zwei sehr ähnliche Ausführungen, einen intelligenten Pulskompressor, der den optimalen Abstand zwischen Gittern berechnet und einen normalen Gitterkompressor, der einen gegebenen Abstand zwischen den Gittern simuliert. Bei dem intelligenten Gitterkompressor wird der optimale Abstand gefunden, indem die Dispersion zweiter Ordnung (SOD oder GDD) in dem Eingangspuls minimiert und die Peakintensität im Ausgangspuls maximiert wird. Als Gitterparameter können die Gitterkonstante, der Einfallswinkel (Winkel zwischen Strahl und Gitternormalen), die Beugungsordnung und die Größe der Gitter festgelegt werden. Die Dispersion zweiter und dritter Ordnung der spektralen Phase wird simuliert.

Prism Compressor.vi

Dieses Element existiert ebenfalls in zwei Ausführungen: dem intelligenten Prismenkompressor und den normalen Prismenkompressor. Die Eingangsparameter

für den Prismenkompressor sind der Einfallswinkel des Laserstrahls auf das Prisma, das Prismenmaterial, der Öffnungswinkel der Prismenspitze, die Einstrahlposition auf die Prismen (reguliert den Weg durch das Prismenglas) und die Größe der Prismen. Der Einfallswinkel kann auch über den Brewsterwinkel und den Winkel geringster Abweichung festgelegt werden. Die Berechnung kann entweder exakt oder analytisch erfolgen. Die Dispersion zweiter und dritter Ordnung der spektralen Phase wird simuliert.

Transparent (non)linear medium.vi

Mit einem dieser Elemente kann die Wechselwirkung der ultrakurzen Pulse entweder mit einem linearen oder einem nichtlinearen Medium simuliert werden. Die Länge und das Glasmaterial können festgelegt werden. Im nichtlinearen Fall existieren jedoch nur ausgewählte nichtlineare Brechungsindex Informationen. Der eingehende Strahldurchmesser legt die Intensitätdichte fest. Mit dem nichtlinearen Element können somit die linearen und nichtlinearen Wechselwirkungen (nur Selbstphasenmodulation) der ultrakurzen Pulse in einer optischen Faser simuliert werden. Die numerische Simulation verwendet den Split-Step-Fourier-Transform-Algorithmus [Agrawal, 2002]. Dazu teilt das Programm die Wegstrecke in Intervalle auf, in denen die linearen und nichtlinearen Effekte nacheinander getrennt berechnet werden. Da der lineare Anteil in der Frequenzdomäne und der nichtlineare Anteil in der Zeitdomäne berechnet werden, ist eine Fourier-Transformation notwendig, um zwischen beiden Domänen hin und her zu wechseln. Die Anzahl der Intervalle kann manuell festgelegt werden. Alternativ dazu gibt es noch ein weiteres Element, eine optische Faser. Damit können neben der Selbstphasenmodulation (SPM) noch die Selbstaufteilung und Ramaneffekte betrachtet werden. Die optische Faser und das nichtlineare Medium liefern dieselben Ergebnisse, wenn keine negativ oder positiv gechirpten Eingangspulse verwendet werden. Bei Verwendung von gechirpten Eingangspulsen gibt es Abweichungen und die optische Faser liefert keine realistischen Ergebnisse. Die Abweichungen betreffen die Simulation der Dispersion, dies wurde bei kleinen Leistungen (0,01 mW) verifiziert. Bei den hier verwendeten Pulsleistungen ist es zudem ausreichend, nur die SPM zu betrachten. Die linearen Eigenschaften der Materialien sind z.B. über die Sellmeier Gleichung 1.36 implementiert. Der wellenlängenabhängige Brechungsindex für Quarzglas (fused silica, SQ1) und Borosilikatglas (BK7) ist in Abbildung 2.9 gezeigt. Der Simulationsparameter für die SPM ist der nichtlineare Brechungsindex n_2 (siehe Gleichung 1.49). Für einige Materialien ist der nichtlineare Brechungsindex allerdings ohne Wellenlängenabhängigkeit implementiert. Die Simulationsparameter für SQ1 und BK7 sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Es existieren relativ wenige Materialien, bei denen der nichtlineare Brechungsindex bestimmt wurde. Eine Übersicht ist bei Adair, Chase und Payne [1989] zu finden. Für SQ1 gibt es relativ viele Messungen, die allerdings auch eine breite Streuung der Werte aufweisen. Eine Auswahl des nichtlinearen Brechungsindex für SQ1 für verschiedene Wellenlängen ist bei Milam [1998] zu finden. Der Kern einer Glasfaser besteht allerdings meist aus Quarzglas dotiert mit Germaniumdioxid, wodurch der Brechungsindex erhöht wird. In der Literatur finden man Messungen des nichtlinearen Brechungsindex für verschiedene Monomodefasern (SQ1 dotiert mit Germaniumdioxid). Dort ergibt sich ein nichtlinearer Brechungsindex von $n_2 = 2,62 \times 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{W}$, für reine SQ1-Fasern $n_2 = 2,36 \times 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{W}$ (Messunsicherheit 5%, Wellenlänge 1319 nm, Kim u. a. [1994]). Die Abhängigkeit des nichtlinearen Brechungsindex von der Konzentration

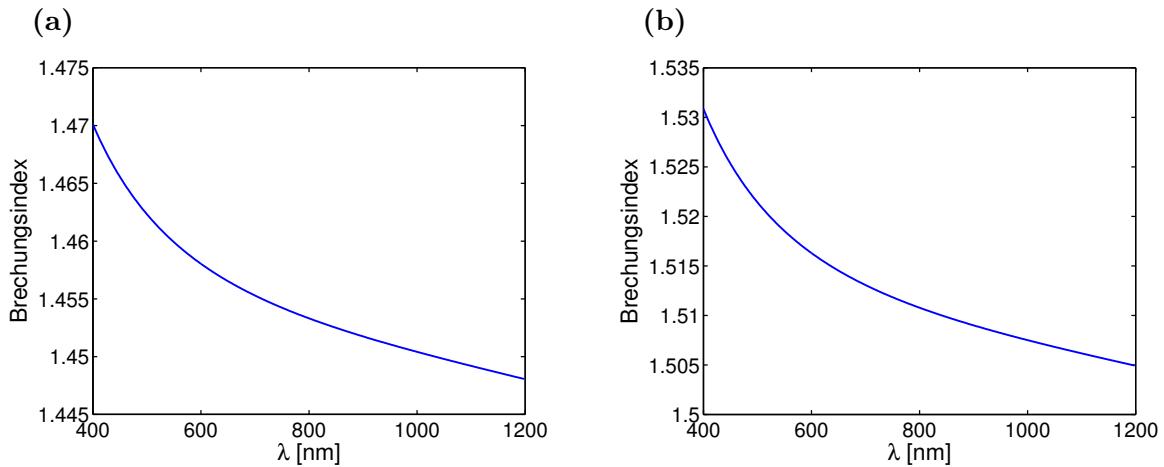


Abbildung 2.9 Brechungsindex für (a) Quarzglas (SQ1) und (b) Borosilikatglas (BK7)

	SQ1	BK7
Sellmeier Koeffizienten		
B_1	0,696 166 3	1,039 612 12
B_2	0,407 942 6	0,231 792 344
B_3	0,897 479 4	1,010 469 45
C_1	$4,679\ 148\ 00 \times 10^{-3}\ \mu\text{m}^2$	$6,000\ 698\ 67 \times 10^{-3}\ \mu\text{m}^2$
C_2	$1,351\ 206\ 00 \times 10^{-2}\ \mu\text{m}^2$	$2,001\ 791\ 44 \times 10^{-2}\ \mu\text{m}^2$
C_3	$97,934\ 000\ 0\ \mu\text{m}^2$	$1,035\ 606\ 53 \times 10^2\ \mu\text{m}^2$
$n(800\ \text{nm})$	1,4533	1,5108
$n(1040\ \text{nm})$	1,4499	1,5070
n_2	$3,0 \times 10^{-16}$	$4,7 \times 10^{-16}$

Tabelle 2.5 Simulationsparameter für Quarzglas (SQ1) und Borosilikatglas (BK7)

X der Dotierung (Germaniumdioxid und Fluorine) wurde von Kato, Suetsugu und Nishimura [1995] bei einer Wellenlänge von 1550 nm untersucht:

$$n_2(\text{GeO}_2 - \text{SiO}_2) = (2.76 + 0.0974X)\text{cm}^2/\text{W} \quad (2.5)$$

2.11 Gewebeproben und Färbung

Ein vielversprechender Farbstoff zur *in vivo* Färbung ist Kresylviolett. Der Farbstoff wird zur Färbung der Nissl-Schollen in Nervengewebe verwendet [Alvarez-Buylla, Ling und Kirn, 1990]. Nissl-Schollen sind Zellorganellen, die dem endoplasmatischen Retikulum in gewöhnlichen Zellen entsprechen. Furuta u. a. [1985] verwendet als einer der ersten den Farbstoff klinisch zur *in vivo* Detektion von Karzinomen der Magenschleimhaut mit einem Endoskop das, im Vergleich zu einem herkömmlichen Endoskop, den zu untersuchenden

Bereich vergrößert. Der Farbstoff besitzt in Japan für diese Methode (Chromoendoskopie) eine klinische Zulassung und wurde ebenfalls in anderen Ländern getestet. Zur konfokalen Detektion berichten George und Meining [2003] eine *ex vivo* Verwendung von Kresylviolett in einer optimalen Konzentration von 2%. In Voruntersuchungen am Laser-Forschungslabor konnte für eine optimale Färbung von Blasenepithelzellen eine Konzentration von 1%-5% bestätigt werden. Das Gewebe stammt von Kaninchen, die im Rahmen eines durch die Bayerische Forschungsstiftung geförderten Projektes (KZ: 712/16 - Betamod) untersucht wurden. Das Gewebe wurde kurz nach der Euthanisierung des Tieres entnommen und eingefroren. Nach dem Auftauen des Gewebes wurde dieses für 2 min in unterschiedlich mit Ringerlösung verdünnten Kresylviolett Lösungen gelegt. Die Herstellung dieser Lösung erfolgte, indem zunächst eine 1,1 mM Stocklösung (siehe Tabelle 2.6) hergestellt, diese im Ultraschallbad für 30 min auf 60 °C erhitzt und dann im Verhältnis 1:10 bis 1:20 mit Ringerlösung verdünnt wurde. Bedingt durch die schlechte Löslichkeit des Farbstoffes wird die Molarität und die Prozentangaben der Lösung für einen Farbstoffgehalt laut Hersteller von 70% angegeben. Durch Zentrifugieren der Stocklösung wurden ungelöste Partikel abgesetzt.

Stocklösung Kresylviolett (C1791)	
molare Masse	321 g/mol
Farbstoffgehalt	70 %
abgewogene Masse	16.5 mg
Volumen destilliertes Wasser	33 ml

Tabelle 2.6 Herstellung von 1,1 mM Stocklösung Kresylviolett (C1791, Sigma-Aldrich, St. Louis)

2.12 Variable Fokussiereinheit

2.12.1 Anforderungen und Konzepte

Im Rahmen einer Bachelorarbeit von Judith Mittag [Mittag, 2009] wurden verschiedene Konzepte zur Verstellung der Fokussierung untersucht. Ziel war es eine Fokussiereinheit (z-scan) zu bauen, mit der gezielt unterschiedliche Tiefen im Gewebe angefahren werden können. Dafür ist es notwendig am distalen Ende des Endoskops eine miniaturisierte Verstellung zu integrieren. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf den Verstellungsmechanismus und nicht auf das optische Design gelegt. Daher wurde mit den am LFL vorhanden Mikrooptiken gearbeitet. Es gibt zwei Ansätze, die verfolgt werden können. Zum einen kann durch eine Verschiebung der Optik bzw. von Teilen der Optik eine Veränderung der Fokussierung erreicht werden. Zum anderen kann bei einem festen Arbeitsabstand der distalen Optik die Entfernung dieser zum Gewebe verändert werden. Bei einer Verschiebung der Optik oder Teilen der Optik wird ohne ein spezielles optisches Design (Zoomoptik) die numerische Apertur des Objektivs und damit die Auflösung verändert. Einfacher ist der zweite Ansatz, ein Design zu

verwenden, bei dem mit einem möglichst großen Arbeitsabstand der Mikrooptik gearbeitet wird. Am distalen Ende des Endoskops befindet sich eine variable Einheit, die den Abstand der Mikrooptik zum Gewebe verändert. Den Abschluss bildet zum Beobachten ein Glasfenster. Dieser Ansatz wurde favorisiert auch unter dem Aspekt, dass in dem Konzept der vorhandenen Mikrooptik (siehe Kapitel 2.6.1) bereits mit einem Glasfenster gearbeitet wurde. Ein möglicher geringfügiger Umbau der zu verstellenden Einheit ist bei der Konzeptauswahl berücksichtigt. Die Anforderungen an eine solche Fokussiereinheit sind in Tabelle 2.7 zusammengestellt. Bei Berücksichtigung dieser

	Mindestanforderungen	Wunschvorgaben
Scantiefe	100 μm	500 μm
Geschwindigkeit	1 Scan pro Sekunde	0,08 Scans pro Sekunde
Anzahl der Positionen	2	100 bei 5 μm Schritten
Auflösung	2	100 bei 5 μm Schritten
3D-Fähigkeit	Potential gefordert	Positionsinformation für 3D
Durchmesser	Millimeterbereich bzw. das Potential zur weiteren Minimierung	2,8 mm
Robustheit	Potential gefordert	gefordert
Biokompatibilität	muss möglich sein	gefordert
elektrische Sicherheit	kleine Strome und Spannungen möglich	keine stromführenden Teile am distalen Endoskopende
Langlebigkeit	Verschiebung sollte mehrmals erzeugt werden können	gefordert
Reproduzierbarkeit	Fehler liegen im Bereich der axialen Auflösung	

Tabelle 2.7 Anforderungen an eine variable Fokussiereinheit

Anforderungen scheiden bereits einige prinzipiell vorstellbare Realisierungen aus, wie z.B. die Piezotechnik, einen Mikromotor [Flusberg u. a., 2005] oder Flüssiglinsen [Kuiper und Hendriks, 2004]. Nach einer Literaturrecherche erschienen Konzepte, die auf dem Prinzip der Hydraulik, der Pneumatik, dem Bowdenzug oder der thermischen Verformungen beruhen am vielversprechendsten. Ein hydraulischer Ansatz für die Endomikroskopie wurde von [Sabharwal u. a., 1999] vorgeschlagen. Dieser Ansatz realisiert eine Bewegung der Optik relativ zur Faser. Ein Flüssigkeitsreservoir zwischen der Optik und der Faser sorgt durch eine kontrollierte Befüllung für unterschiedliche Abstände. Das Design beinhaltet mehrere Mikrolinsen und ermöglicht bei einer numerischen Apertur von ca. 0,5 einen Scanbereich von ca. 100 μm . Eine genauere Analyse der Funktionalität der Fokussierungseinheit wurde nicht beschrieben. Problematisch könnte das Abdichten des Flüssigkeitsreservoirs gegenüber der restlichen Optik und dem Gewebe und damit ein unkontrolliertes Entweichen der Flüssigkeit sein. In einem anderen hydraulischen Ansatz von Sung u. a. [2002] wurde durch ein Wasserreservoir zwischen der letzten Linse einer Mikrooptik und der Geweboberfläche der Abstand durch Ansaugen variiert. Die Durchführbarkeit eines solchen Ansatzes im klinischen Alltag ist, z.B. durch mögliche Luftblasen in dem Wasserreservoir, nur eingeschränkt möglich. Aufbauend auf den

Erfahrungen der Publikation von [Sabharwal u. a., 1999] verfolgt Rouse u. a. [2004] einen pneumatischen Ansatz. Das Design der Mikrooptik wurde verbessert. Damit konnte bei einer numerischen Apertur von 0,46 eine maximale Scantiefe von 200 µm erreicht werden. Eine starke Hysterese und Schwierigkeiten in der Positionierung zeigen die Schwächen dieses Ansatzes. Einige Konstruktionen sind Spezialanfertigungen, damit z.B. eine gute Abdichtung des Luftraumes gewährleistet ist. Dieser Ansatz erschien somit aufwendig zu realisieren. Die fehlende Literatur nach Rouse u. a. [2004] deutet darauf hin, dass dieser Ansatz in der Fachwelt nicht weiter verfolgt wurde. Die Idee einer Realisierung der variablen Fokussiereinheit mit Hilfe eines Bowdenzugs wurde im LFL innerhalb des Komed-Projekts vorgeschlagen. Dieser Ansatz besitzt zwar das Potenzial, relativ einfach realisierbar zu sein, allerdings ist zu erwarten, dass ein solcher Ansatz weniger präzise als eine hydraulische oder pneumatische Version wäre. Weiterhin wurde von Judith Mittag eine Idee vorgeschlagen, bei der mit einem Zusammenschluss mehrerer Faserbündeln gearbeitet wird. Jedes Faserbündel ist mit einer Mikrooptik verbunden. Die verwendeten Mikrooptiken besitzen einen unterschiedlichen Arbeitsabstand und damit eine variierende Fokustiefe (Revolverprinzip). Dieses Prinzip erfüllt die Mindestanforderungen bis auf die 3D-Fähigkeit. Für eine steigende Anzahl von gewünschten Positionen muss bei diesem Ansatz auch die Anzahl der Faserbündel erhöht werden. Mit jedem Faserbündel steigt entweder der Außendurchmesser oder die einzelnen Faserbündel besitzen weniger Bildpunkte, womit sich der Bildausschnitt pro Position reduziert. Allerdings müsste in einem klinischen Einsatz überprüft werden, ob der behandelnde Arzt eine solche Lösung wegen der einfachen Bedienung möglicherweise vorzieht.

2.12.2 Konzept auf Basis von Formgedächtnislegierung

Ein weiterer möglicher Ansatz beruht auf der thermischen Verformung von Formgedächtnislegierungen. Die Inspiration zu diesem Ansatz lieferte eine Patentschrift der Firma Pentax, in der die Nutzung einer Formgedächtnislegierung erwähnt wurde [Kanai, 2005], wobei die Nutzung von Formgedächtnislegierungen nicht Bestanteil der Patentansprüche ist. Formgedächtnislegierungen besitzen einen temperaturabhängigen Phasenübergang zwischen zwei festen Phasen, der Tieftemperaturphase (Martensit) und der Hochtemperaturphase (Austenit) [Asua u. a., 2009]. Eine Änderung der Scherung in der Kristallstruktur ist für eine Änderung der Form in der Hochtemperaturphase verantwortlich. In der Hochtemperaturphase kann der Formgedächtnislegierung zusätzlich eine bestimmte Form aufgeprägt werden. Durch Erwärmung kann dann die Legierung die aufgeprägte Form annehmen und sich an diese Form „erinnern“. Daher kommt auch der Name Formgedächtnislegierung (= „shape memory alloy“). In dieser Arbeit wurde der extrinsische Zweiwegeeffekt verwendet, bei dem durch das Anlegen einer äußeren Kraft, z.B. einer Feder, aktiv eine Scherung in der Kristallstruktur hervorgerufen wird. Durch Erwärmung der Legierung, z.B. durch Strom, wird ein Phasenübergang induziert, der zu einer Verkürzung der Länge in einer Richtung der Kristallstruktur führt. Bei einem Draht wird dieser Effekt so ausgenutzt, dass es zu einer Verkürzung der Länge des Drahtes kommt. Dabei kann der Draht Arbeit verrichten. Beim Abkühlen ändert sich die Kristallstruktur wieder. Es ist eine externe Kraft notwendig, um so wieder eine Scherung hervorzurufen. Im Vergleich zum intrinsischen Zweiwegeeffekt ist eine größere Belastbarkeit (größere Kraft und höhere Lebensdauer) der Legierung zu erwarten. Eine der bekanntesten

Formgedächtnislegierungen ist Nitinol, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Nitinol ist eine Abkürzung aus den Namen der beiden Hauptbestandteile Nickel und Titan und dem Namen des Entwicklungslabor, dem Naval Ordnance Laboratory (USA).

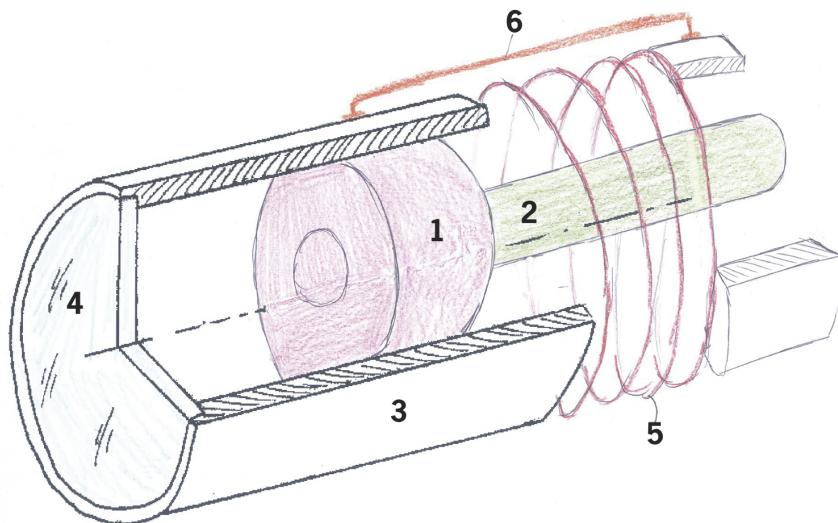


Abbildung 2.10 Konzept einer variablen Fokussiereinheit mit Nitinol

In der Arbeit wurde ein Nitinoldraht (6) verwendet, der zwischen der Mikrooptik (1) und einem beweglichen Schlitten (3+4) gespannt wird (Abbildung 2.10). Die Faser (2) und die Mikrooptik (1) sind fest miteinander verbunden. Die Feder (5) ist zwischen dem beweglichen Schlitten und der Mikrooptik befestigt, um den Nitinoldraht im Ruhezustand zu spannen (externe Kraft). Bei der Stromapplikation erwärmt sich der Draht und zieht sich zusammen. Durch die Befestigung des Drahts an dem beweglichen Schlitten (3+4) und der mit der Mikrooptik fest verbundenen Faser, wird der Abstand der Mikrooptik zur Gewebeoberfläche verkleinert. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass zu dem Zeitpunkt der Bachelorarbeit außer der Patentschrift keine Veröffentlichungen für eine endoskopische Nutzung von Nitinol vorlagen. Dagegen spricht der Einsatz von elektrischer Energie, die zum Erwärmen des Nitinoldrahts erforderlich ist, da ein klinischer Einsatz von Spannungen oder Strom im menschlichen Körper kritisch zu betrachten ist. Da hier aber nur sehr kleine Ströme (ca. 150–330 mA) und Spannungen (ca. 0,5–0,8 V) notwendig sind wurde das Konzept weiterverfolgt. Einen weiteren Nachteil könnte die begrenzte Haltbarkeit bzw. Ermüdung des Drahts darstellen, die ca. bei 100 000 Zyklen liegt. Die geringen Anschaffungskosten des Drahts und des weiteren Zubehörs sind dafür von Vorteil. Zudem von Vorteil ist, dass sich das Material Nitinol bereits im breiten klinischen Einsatz befindet und eine biologische Verträglichkeit gegeben ist [Duerig, Pelton und Stöckel, 1999]. Eine spätere Veröffentlichung von Wu u. a. [2010] bestätigt die Vorteile der Nutzung von Nitinol zur Verstellung der Fokustiefe für endomikroskopische Anwendungen. Letztendlich war der ausschlaggebende Vorteil neben einer Bewegung zwischen zwei Positionen eine mögliche Realisierung von Zwischenschritten mit Hilfe einer Positionskontrolle über den elektrischen Widerstand des Nitinoldrahts. Die bisherigen Messungen [Ma, Song und Lee, 2004] wurden dabei mit einem größeren Aufbau mit einem längeren Nitinoldraht (228,6 mm) durchgeführt. Teil dieser Arbeit ist es daher abzuschätzen, ob die Ergebnisse

von Ma, Song und Lee [2004] sich auch auf kürzere Aufbauten und Drahtlängen übertragen lassen. Mit Hilfe der Information über die Position ist somit auch das Potenzial zu einer 3D-Darstellung gewährleistet. Weiterhin soll aber auch getestet werden, ob bereits mit unterschiedlichen Spannungsstärken Zwischenpositionen realisiert werden können.

2.12.3 Eigenschaften von Nitinol

Für die Versuche wurde ein Nitinoldraht, Flexinol®(Dynalloy Inc., Tustin, CA), mit einem Durchmesser von 152 μm verwendet. Die Eigenschaften sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst. In der praktischen Anwendung sind allerdings noch weitere Eigenschaften zu beachten (siehe Müller [2007]). Bei der Verwendung des extrinsischen

152 μm	
Durchmesser	152 μm = 0,006 Inches
Widerstand R_M	(52 \pm 3) Ω/m
Max. Zugkraft	(4,0 \pm 0,2) N
Aktivierungsstrom	min. 330 mA bei 20 °C
Kontraktionszeit	1 Sekunde
Abkühlungszeit	2,0 Sekunden
Kontraktion	3 bis 5%
Arbeitstemperatur	70 °C

Tabelle 2.8 Datenblatt für den Nitinoldraht. Als Quelle wurden die mitgelieferten Datenblätter von dem Lieferanten www.nitinoldraht.de und dem Hersteller Dynalloy verwendet. (Abweichung der Angaben wurden in die Unsicherheit der Angaben berücksichtigt)

Zweiwegeeffektes ist zu beachten, dass durch eine externe Kraft der Nitinoldraht in seine Ausgangsphase überführt wird. Diese Kraft wird durch eine Feder aufgebracht. Die Kontraktion des Nitinoldrahts beträgt laut Hersteller 3-5% und hängt von der genutzten Konfiguration ab, d.h. der Art der Rückstellkraft und die äußere Form des Nitinols. In der hier verwendeten Konfiguration als Draht mit einer Feder als Rückstellkraft beträgt die zu erwartende Kontraktion 3%. Die Drahtlänge entspricht bei den Experimenten 26,5 mm, woraus sich eine Verkürzung der Drahtlänge um ca. 800 μm ergäbe. Das ist mehr als die geforderten 500 μm . In Vorexperimenten haben sich jedoch bereits Abweichungen von den 3% gezeigt, daher wurde ein Sicherheitspuffer gewählt. Bei der Kontraktion des Nitinoldrahts muss dieser hauptsächlich Kraft aufwenden, um die eingebaute Feder zu komprimieren. In erster Näherung kann das Gewicht der Mikrooptik gegenüber der Kraft der Feder vernachlässigt werden. Die vom Nitinol aufgewendete Kraft sollte jedoch nicht der maximalen Zugkraft entsprechen, da die Belastung auf dem Nitinoldraht für eine mehrfache Benutzung zu hoch wäre. Die Kraft sollte etwa einem Drittel der maximalen Zugkraft entsprechen. Die Arbeit, die der Nitinoldraht während der Kontraktion ausüben muss, hat einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Kontraktion, aber auch auf die Abkühlungszeit. Wenn eine größere mechanische Spannung an dem Draht anliegt, wird die Abkühlungszeit kürzer. Die Geschwindigkeit der Kontraktion hängt allerdings nicht nur

von der Belastung sondern auch von der Stromstärke ab. Die Stromstärke sollte möglichst klein gehalten werden, um den Draht nicht zu überhitzen und somit zu zerstören. In der Regel wurde eine Stromstärke vom 1,5 fachen Wert des Aktivierungsstroms verwendet. Größere Ströme sollten nur für sehr kurze Zeit appliziert werden. Die Temperatur sollte dabei 90 °C nicht überschreiten.

2.12.4 Versuchsanordnung

In dem verwendeten Aufbau wurde das Konzept aus Abbildung 2.10 umgesetzt. Dazu wurde zunächst ein Faserbündel (IGN08/30, siehe Tabelle 2.3) mit zwei GRIN-Linsen (GRIN-Linsen-System) verklebt. Die GRIN-Linse direkt am distalen Ende des Faserbündels (Koppelinse) kollimiert das Licht aus den einzelnen Fasern. Mit der nachfolgenden GRIN-Linse (Objektivlinse) wird das Licht fokussiert. Das GRIN-Linsen-System wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Oleksandr Lykhvar charakterisiert [Lykhvar, 2004]. Der Arbeitsabstand wurde dabei mit ca. 530 µm bemessen. Ziel war es, die GRIN-Linsen und das Faserbündel möglichst verkippungsarm miteinander

	Koppelinse	Objektivlinse
NA	0,2	0,6
Hersteller	GRINTECH	OptoSigma
Durchmesser		1,8 mm
Länge	11,76 mm	3,0 mm
Arbeitsabstand	0 mm	nicht angegeben
Pitch	0.25	0.2

Tabelle 2.9 GRIN-Linsen-System

zu verbinden, da im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführte Simulationsrechnungen die Verschlechterung der Bildqualität bei Verkippungen der GRIN-Linsen aufzeigte. Der kleinere Durchmesser des Faserbündels wurde mit einer Stahlhülse an den Durchmesser des GRIN-Linsensystems angepasst (siehe Abbildung 2.11). In einer weiteren Stahlhülse können somit das Faserbündel und das GRIN-Linsensystem gerade auf einander gesetzt werden und mit Silikon verbunden werden. Silikon eignet sich zur Fixierung, da Silikon sehr wenig Autofluoreszenz besitzt und wieder entfernt werden kann. Zur Befestigung der Federn wurden zwei äußere Stahlhülsen aufgebracht. Dabei ist die grün markierte Stahlhülse frei beweglich und die rote Stahlhülse fest mit dem Faserbündel-GRIN-Linsen-System verbunden. Als Abschluss an den beweglichen Schlitten ist ein Glasfenster vorgesehen. Der Nitinoldraht wurde mit Hilfe der Kabelschuhe an den beiden äußeren Hülsen befestigt (siehe Abbildung 3.5). Die freibewegliche Stahlhülse verändert bei Kontraktion des Nitinoldrahts somit den Abstand zum Objekt. Im Folgenden wird diese Stahlhülse als Schlitten bezeichnet. Die äußeren Stahlhülsen wurden noch mit jeweils einem Schrumpfschlauch isoliert, um einen unkontrollierten Stromfluss über die Stahlhülsen bei der Stromapplikation zu verhindern. Bei den Versuchen wurden zwei

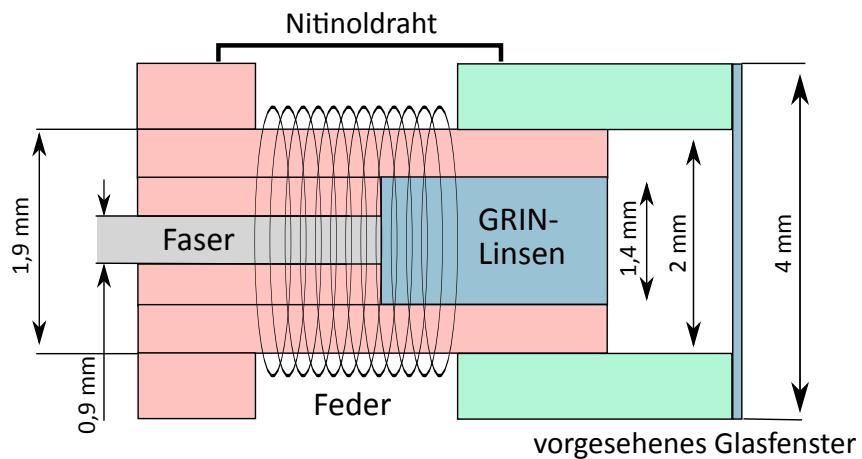


Abbildung 2.11 Skizze der Montage der Faser, Mikrooptik und des Schlittens

Federn (D-012A) der Firma Gutekunst (Metzingen) in Reihe verwendet. Diese Federn besitzen eine Federhärte von $0,347 \text{ N/mm}$ und eine Länge von $7,1 \text{ mm}$.

2.12.5 Spannungsapplikation

Die Spannungsapplikation erfolgte entweder direkt über ein stabilisiertes Labornetzgerät (EA-4003; 0-30V, 2,5/4 A) der Firma Elektro-Automatik GmbH & Co. KG (Viersen) oder über das Multifunktions-Datenerfassungsmodul (NI-PCI-6111) (siehe auch Kapitel 2.7). Für die hier benötigten Ströme von $330\text{--}495 \text{ mA}$ sind Spannungen von $0,50\text{--}0,77 \text{ V}$ am Nitinoldraht notwendig¹. Um den möglichen Spannungsbereich von $-10\text{--}10 \text{ V}$ des Multifunktions-Datenerfassungsmoduls weitestgehend auszunutzen, wurde eine Transistorschaltung verwendet. Durch einen variablen Widerstand kann der maximale Strom, der bei 10 V Ausgangsspannung des Multifunktions-Datenerfassungsmoduls am Nitinoldraht anliegt, noch variiert werden. Das Multifunktions-Datenerfassungsmodul wurde zur gleichzeitigen Messung und Applikation von Spannungen über einen Computer verwendet. Über zwei Eingangskanäle können mit dem Multifunktions-Datenerfassungsmodul synchron zwei Spannungen eingelesen werden (Auflösung 12 bit, $-10\text{--}10 \text{ V}$), zum einen die Spannung, die an dem Nitinoldraht anliegt und zum anderen die Spannung, die an einem 1Ω Widerstand anliegt (indirekte Strommessung). Aus diesen beiden Werten können der Strom und die Spannung, die am Nitinoldraht anliegen, gemessen werden. Die Spannungsapplikation über den Computer erfolgte, indem die Spannung aus dem Multifunktions-Datenerfassungsmodul sinusförmig erhöht, 10 s konstant gehalten wurde und dann wieder sinusförmig gesenkt wurde. Das Verhalten des Widerstandes innerhalb eines Phasenübergangs des Nitinols kann bei einem sinusförmigen Verlauf besser beobachtet werden als bei einem Rechteckspuls. Die elektrische Applikation ist an das Protokoll von Ma, Song und Lee [2004] angepasst, die sinusförmige Spannungssignale mit einer Frequenz von $1/60 \text{ Hz}$ applizieren. Durch das Einfügen von Spannungsplateaus kann zusätzlich die Kontraktion des Nitinoldrahts

¹berechnet für eine hier verwendeten Länge von c.a. 30 mm, entspricht einem Widerstand von $(1,56 \pm 0,09) \Omega$, siehe Tabelle 2.8

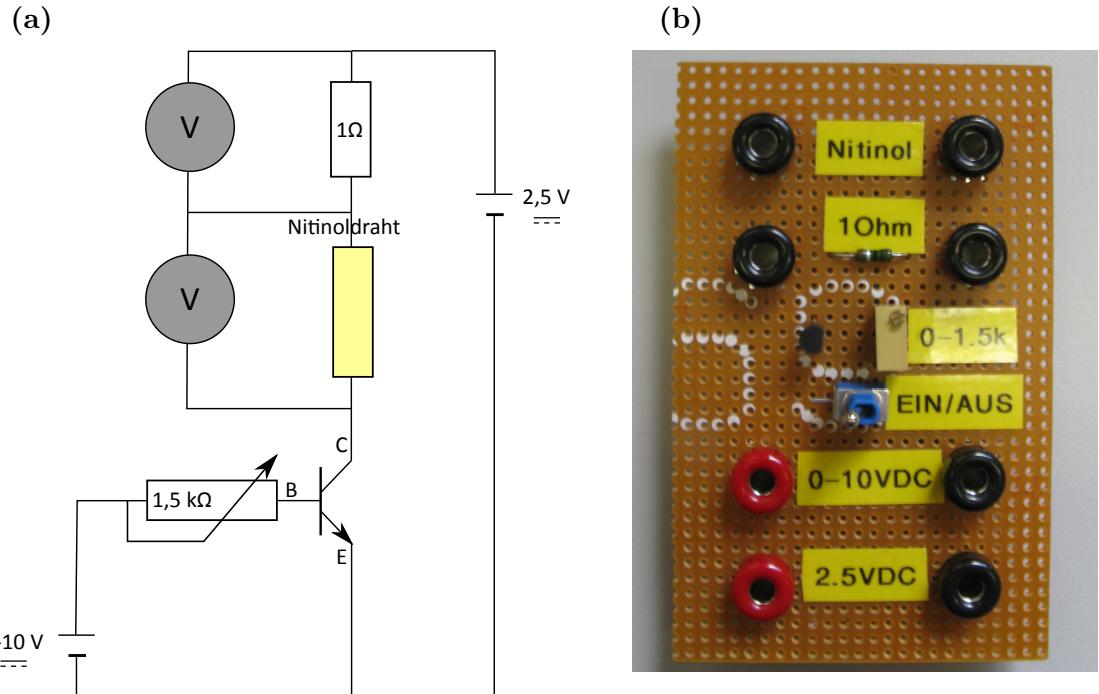


Abbildung 2.12 Stromverstärkung: (a) Transistorschaltung zur Stromverstärkung. PC-Steuerung der Spannungsapplikation am Nitinoldraht über einen Spannungseingang, der von 0–10 V variiert werden kann. Mit einem variablen Widerstand kann der exakte Stromwert am Nitinoldraht festgelegt werden. Über eine indirekte Strommessung können der Widerstand und der Strom, der am Nitinoldraht anliegt, bestimmt werden. Eine externe Spannungsversorgung mit 2,5 V wurde zwischen Emitter und Kollektor des Transistors geschaltet. (b) Anschlüsse der Transistorschaltung.

bei unterschiedlichen Spannungen getestet werden. Zwischen zwei Spannungspulsen wurde 20 s pausiert, um das System relaxieren zu lassen. Die Kontraktionszeit und Relaxationszeit des Nitinoldrahts betragen jeweils 1 s bzw. 2 s (siehe Tabelle 2.8). Mit einer Spannungsapplikation von 10 s wurde gewährleistet, dass sich der Draht nicht unkontrolliert aufheizt und somit keine Maßnahmen getroffen werden mussten, um die Temperatur zu stabilisieren bzw. zu messen.

2.12.6 Bestimmung der Kontraktion des Nitinoldrahts

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Kontraktion der Drahtlänge zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist es, mit Hilfe einer Kamera die Verschiebung von außen zu filmen. Die Position des beweglichen Schlittens kann in den Bildern markiert und gemessen werden. Bei einer erwarteten Kontraktion von 3% (siehe Tabelle 2.8) ist bei einer Drahtlänge von 10–30 mm mit einer Verkürzung der Drahtlänge um 300–900 μm zu rechnen. Für eine Beobachtung der Verschiebung ist daher möglicherweise die Auflösung einer Kamera zu gering. In Vorexperimenten konnten bei einer Drahtlänge von 40 mm mit einer vorhandenen Kamera (Progressive Scan Camera, CV-M10 RS von Jai A/S; Kopenhagen) eine Pixelgröße (hier definiert als reale Größe des Bildes geteilt durch die Anzahl der

Pixel siehe Kapitel 2.7) von $80\text{ }\mu\text{m}$ erreicht werden. Der Fehler der Messung konnte mit 1 Pixel, d.h. $80\text{ }\mu\text{m}$, abgeschätzt werden. In dieser Arbeit wurde daher ein Verfahren mit höherer Auflösung gesucht. Dazu wurde mit Hilfe einer fluoreszierenden Probe die Kontraktion des Nitinoldrahts durch das Faserbündel und die Mikrooptik beobachtet und bestimmt. Da der Nitinoldraht eine Kontraktionszeit von 1 s und eine Relaxationszeit von 2 s hat, ist zur Beobachtung der Kontraktion und des Phasenübergangs während der Stromapplikation eine möglichst schnelle Aufnahmegereschwindigkeit notwendig (ab 5 Hz). Daher wurden Auflichtfluoreszenzbilder durch das Faserbündel mit einer schnellen monochromen CCD-Kamera (C4880-81) von Hamamatsu (Herrsching) bei einer Bildwiederholrate von 36 Hz aufgenommen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer selbstgeschriebenen LabVIEW Routine. Dazu wurde der Faserbündeleingang mit einer Quecksilber Lichtquelle durch ein Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRBE, Wetzlar) mit einem 20x Objektiv (NA 0,5) beleuchtet. Die Fluoreszenzintensität einer ca. $0,5\text{ mm}$ dicken stabil fluoreszierenden Folie (Fluoreszenzstandard) wurde während der Spannungsapplikation detektiert. Durch die Kontraktion des Nitinoldrahts wird der am Schlitten befestigte Fluoreszenzstandard verschoben und die Fluoreszenzintensität nimmt zu, da der Abstand des Fluoreszenzstandards zum Fokuspunkt kleiner geworden ist. Es wurden Bilderserien während vier Spannungspulsen aufgenommen und die Fluoreszenzintensität der Bilder gemittelt. Zur Korrelation der Fluoreszenzintensität mit dem Abstand wurden mit Hilfe des Picomotors (siehe 2.6.3) insgesamt acht Bilderserien des Fluoreszenzstandard in definierten Abständen aufgenommen. Somit konnte die Fluoreszenzintensität als Funktion des Abstandes bestimmt werden (Eichkurve). Der Picomotor übte dabei von außen einen Druck auf den am Schlitten befestigten Fluoreszenzstandard aus und „simuliert“ damit die Bewegung der Kontraktion des Nitinoldrahts. Die Fluoreszenzintensität kann somit in einen Abstand umgerechnet werden. Der Picomotor ist dabei so befestigt, dass auch eine Konfiguration möglich ist, bei der keine Berührung mit dem beweglichen Schlitten vorhanden und die Kontraktion des Nitinoldrahts aufgenommen werden kann.

Um eine spätere Datenanalyse zu ermöglichen, wurden Bildaufnahme und Stromapplikation synchronisiert. Die Spannungsapplikation über das Multifunktions-Datenerfassungsmodul erfolgte allerdings auf einem anderen PC als die Aufnahme der Fluoreszenzbilder. Da eine externe Triggerung der Kamera (z.B. durch das Multifunktions-Datenerfassungsmodul) mit Schwierigkeiten verbunden war, erfolgten die Bildaufnahmen im "Monitor Mode", in dem nach dem Starten der Aufnahme kontinuierlich Bilder gesendet werden. Bei jeder Bildaufnahme und jeder Spannungsaufnahme sowie Applikation wurde der Zeitstempel mit ausgelesen. Jeder Rechner wurde mit Hilfe des Netzwerkzeitprotokoll (ntp = Network Time Protocol) des LRZ (Leibniz-Rechenzentrum) über das Internet auf DCF77-Zeit synchronisiert. Der Spannungsaus- und Eingang wurde mit Hilfe der internen Taktung synchronisiert. Die aufgenommenen Daten konnten somit auf eine synchrone Zeit mit Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts) interpoliert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

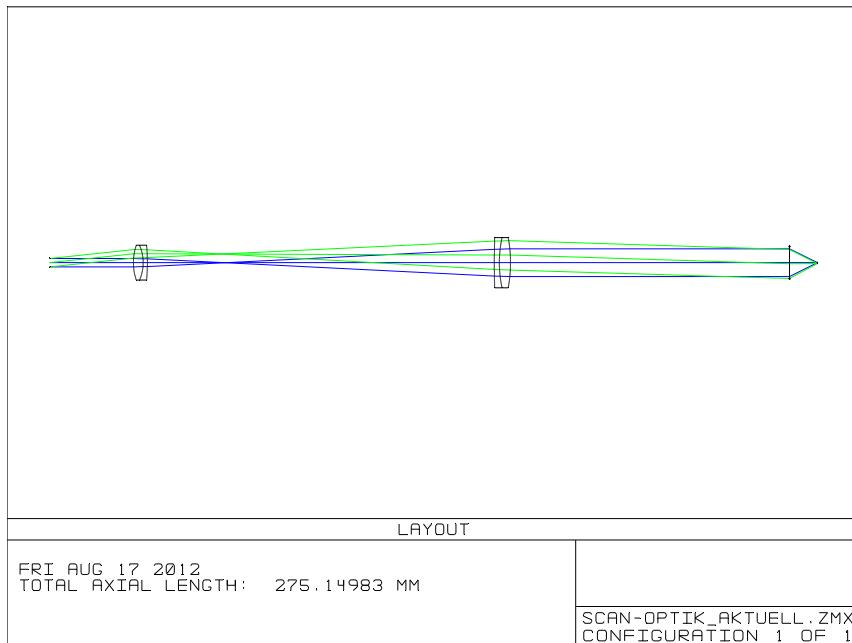
3.1 Systemcharakterisierung

3.1.1 Charakterisierung der Einkoppeloptik

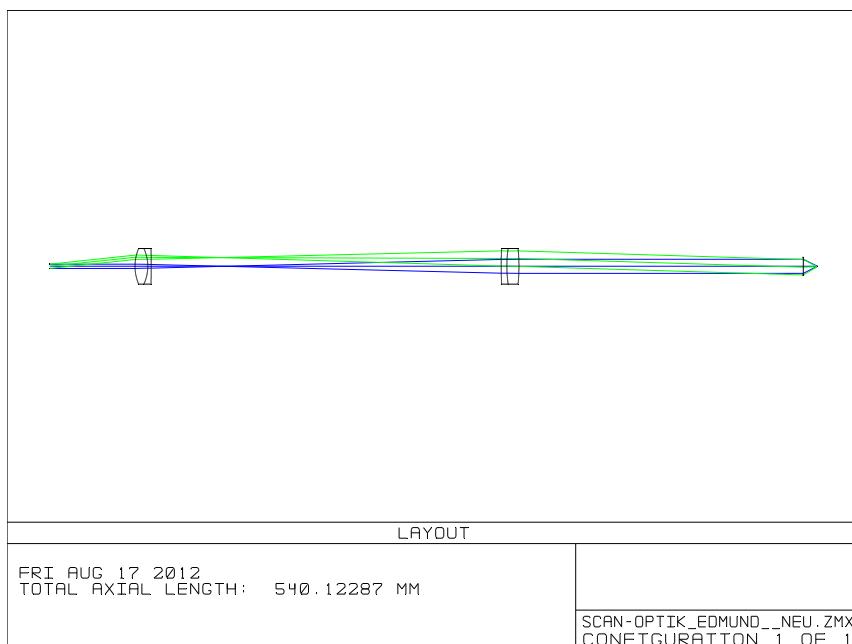
3.1.1.1 Zemaxsimulation

Die Einkoppeloptik, bestehend aus einer Scanlinse, einer Tubuslinse und einem Mikroskopobjektiv, wurde für die zwei verschiedenen Systeme aus Scan, bzw. Tubuslinsen (siehe Material und Methoden 2.4) charakterisiert. Beide Linsensysteme wurden mit Zemax simuliert und verglichen. Zemax ist ein Raytracing Tool und ermöglicht es, den sequenziellen Stahlverlauf durch einen Linsenaufbau mit verschiedenen Materialien und Oberflächen zu simulieren und mit einem Optimierungstool verschiedene Parameter (z.B. den Spotdurchmesser auf einer bestimmten Ebene) zu optimieren. In Abbildung 3.1 sind neben dem Aufbau der beiden Linsensysteme in (a) und (b) noch die Spotdiagramme in (c) und (d) sowie die simulierte MTF (e) und (f) zu sehen. Die Eingangsapertur der simulierten Strahlen wurde auf 3 mm gesetzt und neben den parallelen Hauptstahlen weitere Strahlen (grüne Strahlen in Abbildung 3.1) bis zu einem Scanwinkel von 6° simuliert. Ein Vergleich des simulierten Spotdurchmessers zeigt, dass bei einem Scanwinkel von 6° das optimierte Linsensystem (Edmund Optics) einen kleineren Spotdurchmesser hat als das anfänglich verwendete Linsensystem (Linos Photonics). Dies deckt sich mit den Simulationen der MTF-Kurven. Für die außeraxialen Strahlen ist der Kontrastübertrag für das Linsensystem von Linos schlechter als von Edmund.

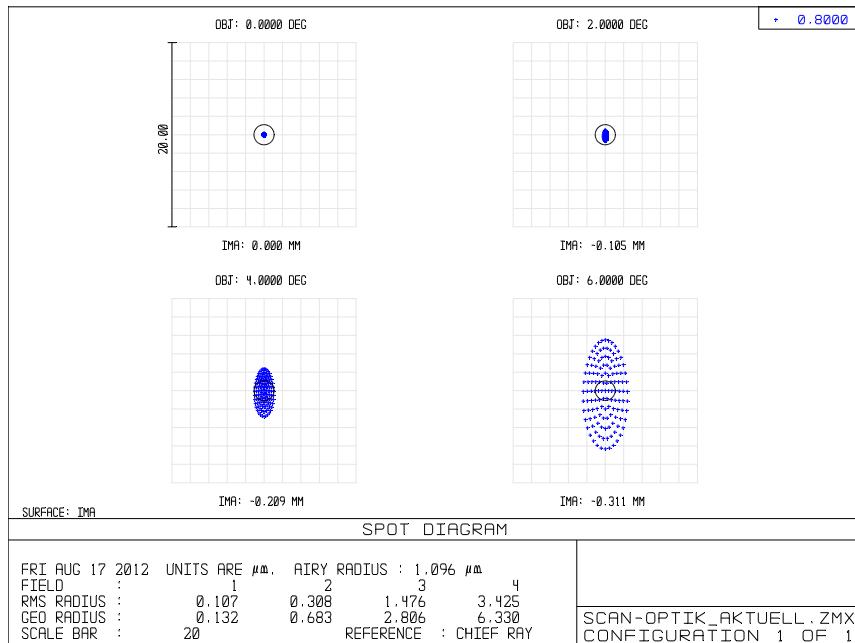
(a)



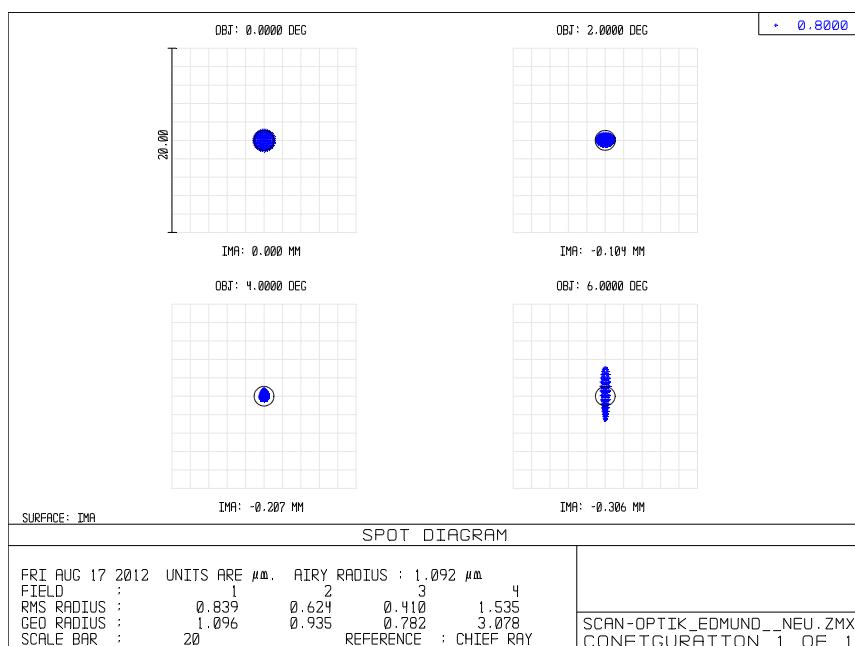
(b)



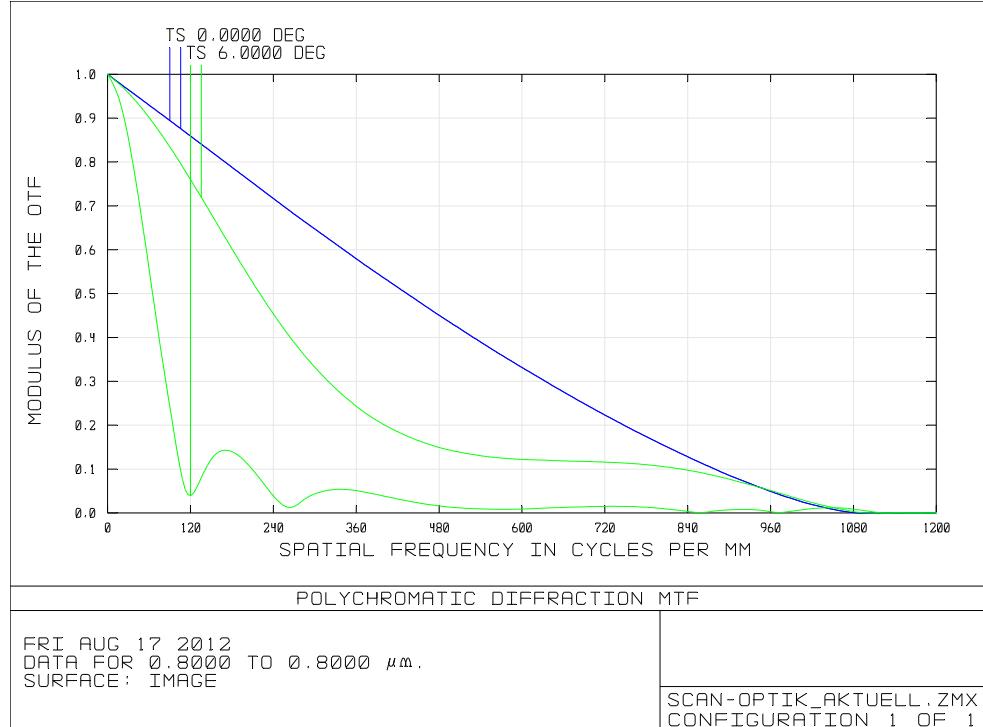
(c)



(d)



(e)



(f)

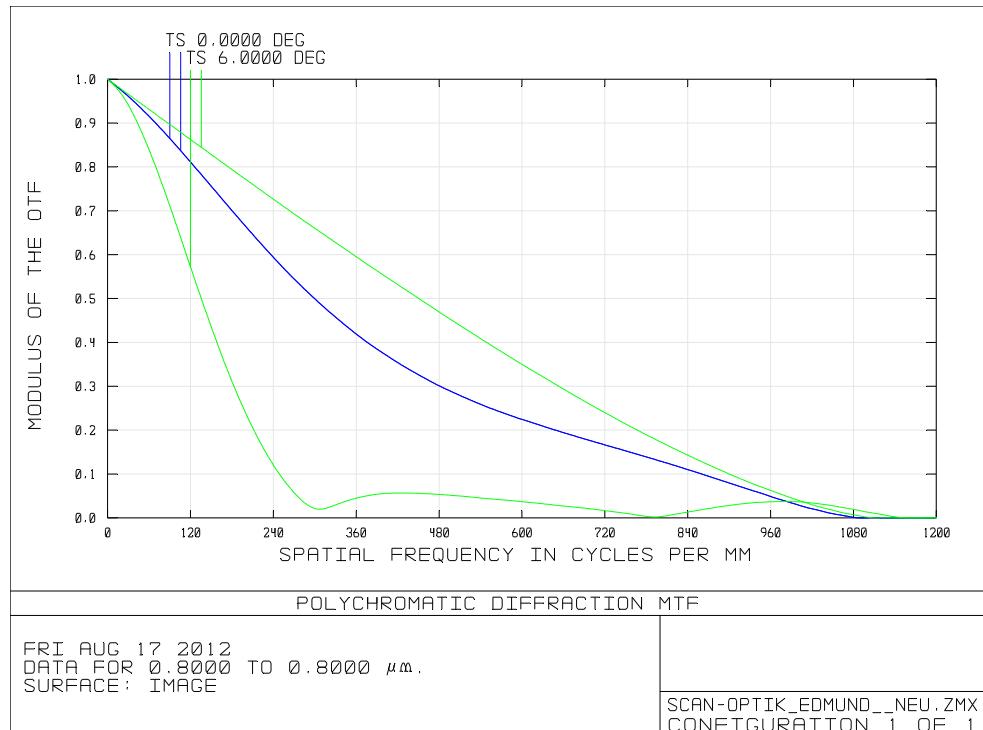


Abbildung 3.1 Vergleich der Einkoppeloptik aus verschiedenen Linsen mit Hilfe von Zemax:
(a), (c) und (e) zeigen Simulationen mit Linsen der Firma Linos Photonics und (b), (d) und (f) das optimierte Linsensystem mit Linsen von Edmund Optics. (a) und (b) zeigen dabei den Aufbau, (c) und (d) die Spotdiagramme (e) und (f) die simulierte MTF

3.1.1.2 Messungen

In einem nächsten Schritt wurde das Ergebnis der Zemax-Simulationen durch verschiedene Messungen überprüft. Die Durchmesser der Scan-, bzw. Tubuslinse zusammen mit dem Mikroskopobjektiv beschränken das Bildfeld und damit den Durchmesser des abrastbaren Faserbündels. Für das Linsensystem von Linos ergibt sich ein Bildfeld von $900\text{ }\mu\text{m}$ (gemessen bei einer Wellenlänge von 532 nm). Mit dem Linsensystem von Edmund konnte das Bildfeld auf $970\text{ }\mu\text{m}$ vergrößert werden. Für eine effiziente Einkopplung in die einzelnen Kerne des Faserbündels müssen allerdings noch mögliche Abbildungsfehler berücksichtigt werden. Eine qualitative Beurteilung der Bildfeldwölbung zeigt, dass mit dem Linsensystem von Edmund eine geringere Verzeichnung realisiert werden konnte. Mit dem Linsensystem von Linos ergaben sich bei dem Faserbündel (IGN 08/30) bei einer Wellenlänge $\lambda_0 = 800\text{ nm}$ Probleme gleichzeitig in der Mitte sowie am Rand der Faser effizient einzukoppeln. Für eine optimale Einkopplung des Laserlichts in die einzelnen Faserkerne wird das Bild des Faserkernbündels bei der Justage scharfgesellt. Durch die Bildfeldwölbung ist es nicht möglich, alle Faserkerne gleich scharfzustellen. Die Intensität des detektierten Fluoreszenzlichtes ist an den Stellen geringer, an denen das Bild weniger scharf ist. Durch den Tausch der Linsen war eine effiziente Einkopplung über den gesamten Durchmesser des Faserbündels auch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1040\text{ nm}$ möglich. Da der Vergrößerungsfaktor bei dem Tausch der Linsen nicht verändert wurde, ergibt sich für beide Linsensysteme eine vergleichbare Pixelgröße im Bildfeld des Faserbündels. Bei einer in der Scannersteuerung eingestellten Pixelgröße von $1\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Material und Methoden 2.7) ergibt sich für das Linsensystem von Linos eine Skala von $(1,35 \pm 0,01)\text{ Pixel}/\mu\text{m}$ und für das Linsensystem von Edmund $(1,34 \pm 0,01)\text{ Pixel}/\mu\text{m}$. Zur weiteren Charakterisierung wurde die laterale Auflösung der Einkoppeloptik überprüft, indem die Punktspreizfunktion (PSF = „point spread function“) von $1\text{ }\mu\text{m}$ (TetraSpeck Microspheres, Life Technologies, Carlsbad) gemessen wurde. Die praktische Auflösung ist dann die Ausdehnung der fluoreszierenden Kugelchen im mikroskopischen Abbild. Die Ausdehnung beschreibt die FWHM der Fluoreszenzintensität des schmalsten Durchmessers der fluoreszierenden Kugelchen aus verschiedenen axialen Ebenen. Für das Linsensystem von Linos wurde eine Ausdehnung der Kugelchen von $(1,8 \pm 0,1)\text{ }\mu\text{m}$ in der Mitte und $(1,9 \pm 0,1)\text{ }\mu\text{m}$ am Rand ($\lambda = 532\text{ nm}$) bestimmt. Für 800 nm verschlechtert sich die Auflösung theoretisch um 14% auf $(2,1 \pm 0,1)\text{ }\mu\text{m}$ bzw. $(2,2 \pm 0,1)\text{ }\mu\text{m}$. Nach dem Tausch der Linsen wurde im Rahmen der Messgenauigkeit eine Ausdehnung der Kugelchen bei $\lambda = 1040\text{ nm}$ von $(1,5 \pm 0,1)\text{ }\mu\text{m}$ sowohl in der Bildmitte als auch beim Bildrand festgestellt. Die Auflösung ist somit besser als mit dem Linsensystem von Linos.

3.1.1.3 Diskussion

Die Einkoppeloptik ermöglicht nach dem Tausch der Linsen eine stabile Einkopplung in die einzelnen Faserkerne über den gesamten Durchmesser des Faserbündels. Mit Hilfe von Zemaxsimulationen und basierend auf den Überlegungen in Material und Methoden (siehe Material und Methoden 2.4) konnte das anfänglich verwendete Linsensystem optimiert werden. Die Zemaxsimulationen dienen dabei als Hilfsmittel, um verschiedene Linsensysteme zu vergleichen. Der angegebene Spotdurchmesser wird mittels Raytracing bestimmt und kann somit nicht direkt mit den Messungen verglichen werden, die als

Eingang einen Gauß'schen Strahl haben. Zudem sind die Details für das Mikroskopobjektiv in der Einkoppeloptik nicht bekannt.

Die zusätzlichen Messungen bestätigen, dass mit dem Tausch des Linsensystems die Bildfeldwölbung, die Größe des Bildfelds und die laterale Auflösung verbessert werden konnten. Ein Ziel bei der Optimierung der Einkopplung ist es, mit möglichst viel Leistung in eine einzelne Faser einzukoppeln. Allerdings gelten für eine Monomodfaser andere Parameter als für eine Mutimodefaser. Bei der Monomodfaser ist eine Anpassung des Fokusdurchmessers auf den **MFD** wichtig. Bei einer Multimodefaser ist die Anpassung der numerische Apertur der Einkoppeloptik auf die numerische Apertur der Faser entscheidend. Der Fokusdurchmesser sollte dabei kleiner sein als der Faserkerndurchmesser. Die Anforderungen für eine effiziente Einkopplung in ein Faserbündel sind nicht eindeutig, da bei den vorliegenden Faserbündeln nicht klar ist, ob nur eine Mode in eine einzelne Faser eingekoppelt werden konnte und welchen MFD die einzelnen Faserkerne besitzen. Daher wurde die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs der Einkoppeloptik möglichst passend zur numerische Apertur des Faserkernbündels gewählt. Bei der Optimierung spielt die Bildfeldwölbung und die Abbildungsqualität der Linsen eine größere Rolle als der simulierte Fokusdurchmesser, da im Wesentlichen das Mikroskopobjektiv die Größe des Fokusdurchmessers bestimmt und das Mikroskopobjektiv sowohl bei der Messung als auch bei der Simulation nicht verändert wurde. Der Fokusdurchmesser kann aber bei der Zemaxsimulation als Maß für die Güte der Abbildungsqualität der Linsen herangezogen werden. Da eine Messung eines Laserstrahldurchmessers im Bereich von Mikrometern nicht möglich war, wurde die laterale Auflösung der Einkoppeloptik gemessen. Die laterale Auflösung ist für beide Linsensysteme ausreichend gut, um eine Einzeladressierung der Faserkerne zu erreichen. Die laterale Auflösung ist aber durch den Tausch der Linsen verbessert worden. Daraus, dass der Vergrößerungsfaktor des Linsensystems und das Mikroskopobjektiv nicht verändert wurden, kann geschlossen werden, dass die Abbildungsqualität der Linsen verbessert werden konnte. Das spiegelt Ergebnisse aus der Zemaxsimulation wieder. Durch die geringere Bildfeldwölbung in der optimierten Einkoppeloptik liegt die Position der Strahltille mit höherer Genauigkeit in einer Ebene. Damit ist eine effizientere Einkopplung über den Durchmesser des Faserbündels möglich als mit dem Linsensystem von Linos.

3.1.2 Distale Optik

3.1.2.1 Laterale Auflösung

Durch die Messung des Vergrößerungsfaktors der distalen Optik kann mit Hilfe des Faserkernabstandes die laterale Auflösung bestimmt werden (siehe Material und Methoden 2.6.3). Als distale Optik wurde einmal verschiedene Referenzsysteme aus zwei Mikroskopobjektiven und eine Mikrooptik von Karl Storz verwendet (siehe Material und Methoden 2.6). Für das Referenzsystem mit einer objektseitigen NA von 0,75 wurde eine Vergrößerung von $M_{distaleOptik} = 3,0 \pm 0,2$ gemessen. Bei einem Faserkernabstand von $(4,0 \pm 0,5) \mu\text{m}$ ergibt sich mit Gleichung 2.4 eine laterale Auflösung von $(2,3 \pm 0,3) \mu\text{m}$. Für die Mikrooptik von Karl Storz wurde eine Vergrößerung von $1,9 \pm 0,3$ gemessen. Die resultierende laterale Auflösung ist damit $(3,5 \pm 0,3) \mu\text{m}$. Zur Beurteilung der lateralen

Auflösung eignen sich Pollenkörner (mixed pollen grains, Carolina;), da diese ein starkes stabiles Fluoreszenzsignal emittieren. Die feinen Strukturen besitzen eine Breite von $(2,0 \pm 0,5) \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 3.2) und können mit dem Referenzsystem (NA 0,75) gut aufgelöst werden. Mit der Mikrooptik ist die Struktur kaum zu erkennen, da diese knapp oberhalb des Bereiches der lateralen Auflösung liegt.

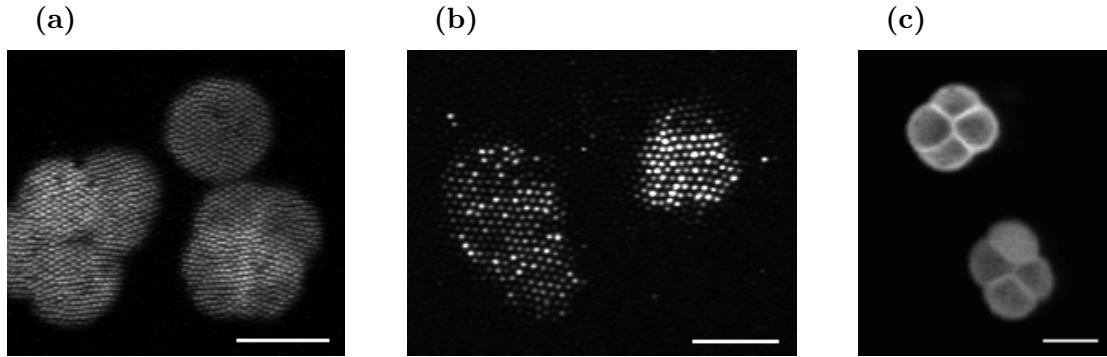


Abbildung 3.2 Struktur von Pollenkörnern zur Beurteilung der lateralen Auflösung: (a) Referenzsystem (40x, NA 0,75) (b) Mikrooptik von Karl Storz (c) Konfokalmikroskop (20x, NA 0,5); Maßstab 20 μm

3.1.2.2 Axiale Auflösung

Das Fluoreszenzsignal einer dünnen fluoreszierenden Schicht eignet sich, um die axiale Antwort der distalen Optik zu beurteilen (siehe Material und Methoden 2.6.3). In Abbildung 3.3 ist das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der z-Position für verschiedene objektseitige numerische Aperturen aufgezeigt. Mit dem Referenzsystem wird mit einer bildseitigen NA von 0,5 eine axiale Auflösung von $(21 \pm 1) \mu\text{m}$ und mit einer bildseitigen NA von 0,75 eine axiale Auflösung von $(3,6 \pm 0,1) \mu\text{m}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ erreicht. Wie zu erwarten wird die FWHM des Fluoreszenzsignals mit zunehmender NA besser. Ein Vergleich der FWHM für die Messung mit der Mikrooptik in Abbildung 3.3 (c) bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ und in (d) bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 1040 \text{ nm}$ zeigt, dass die FWHM mit $(5,4 \pm 0,1) \mu\text{m}$ für die längere Wellenlänge geringfügig breiter als die FWHM mit $(5,3 \pm 0,1) \mu\text{m}$ bei $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ ist. Bei der Auswertung der Fluoreszenzintensität wurde über das gesamte Faserbündel ein Intensitätsmittelwert gebildet. Um auszuschließen, dass der Zwischenraum zwischen den einzelnen Faserkernen einen Einfluss auf das Ergebnis hat, wurde bei der Auswertung zusätzlich eine Maskierung durchgeführt. Die Maskierung ermöglicht es, das Signal der Faserkerne nur mit Hilfe eines Intensitätsschwellwerts auszuwerten. Es ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Auswertungen.

3.1.2.3 Bildfeld

Das Bildfeld des Systems ist gegeben durch den Durchmesser der aktiven Fläche des Faserbündels (siehe Material und Methoden Tabelle 2.3) und der Vergrößerung der distalen Optik $M_{distaleOptik}$. Für das Referenzsystem (NA 0,75) ergibt sich für das Faserbündel

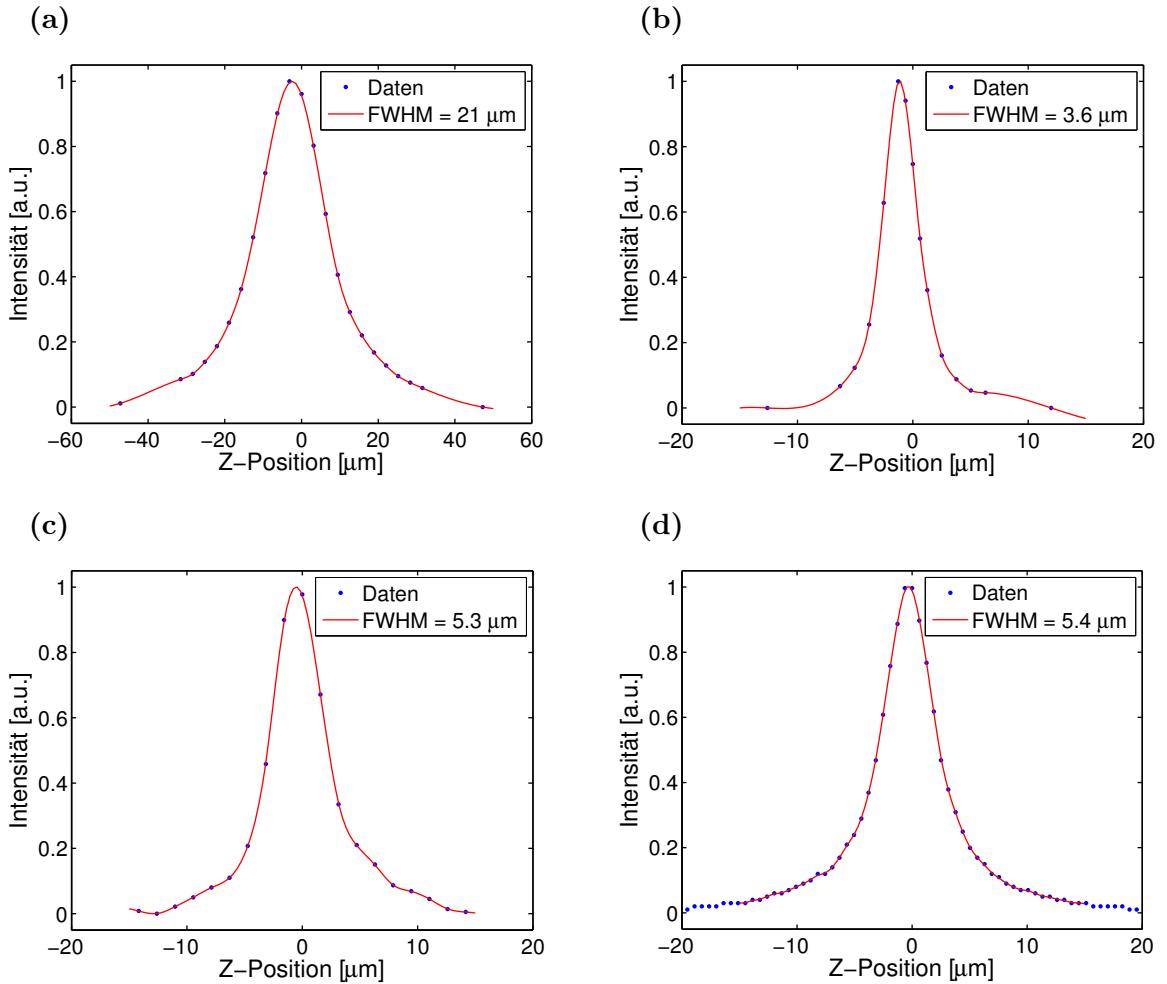


Abbildung 3.3 Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der z-Position für (a) 0,5 und (b) 0,75 als bildseitige NA. Mikrooptik von KST, bildseitige NA 0,6 bei einer Wellenlänge von c) 800 nm und (d) 1040 nm

IGN-08/30 ein Bildfeld von 240 μm. Mit einer kleineren Vergrößerung ergibt sich natürlich auch ein größeres Bildfeld. Bei der Mikrooptik ist der mögliche Außendurchmesser auf 540 μm begrenzt. Der Außendurchmesser des Faserbündels IGN-16/17 ist mit 680 μm geringfügig zu groß. Mit dem verwendeten Faserbündel (IGN-035/06) ergibt sich daher bei einer Vergrößerung von $M_{distaleOptik} = 2$ ein Bildfeld von 157 μm.

3.1.2.4 Diskussion

Die erreichte laterale Auflösung ist mit dem Referenzsystem (NA 0,75) $(2,3 \pm 0,3)$ μm und damit besser als mit der Mikrooptik $((3,5 \pm 0,3)$ μm). Zur Auflösung von Zellen mit Zellkernen reicht die laterale Auflösung beider Systeme aus. Bei feineren Strukturen sind allerdings deutliche Schwächen der Mikrooptik erkennbar (siehe Abbildung 3.2). In einem bereits publizierten und vergleichbaren Aufbau von Göbel u. a. [2004] wurden ebenfalls Pollenkörner aufgenommen. Die Vergrößerung der distalen Mikrooptik betrug $M_{distaleOptik} = 2,5$ bei gleichem Faserkernabstand. Ein Vergleich der Bilder zeigt, dass die

laterale Auflösung damit, wie zu erwarten, zwischen der Auflösung des Referenzsystems (NA 0,75) und der Mikrooptik liegt. Bei der Beurteilung der lateralen Auflösung ist zu beachten, dass die einzelnen Fasern bereits im Anregungsweg die laterale Auflösung im Vergleich zur Auflösung eines Mikroskops verschlechtert. Die Ursache dafür ist, dass die einzelnen Fasern den Transport von nur einer Lichtmode wahrscheinlich nicht ermöglichen und damit keine beugungsbegrenzte Fokussierung möglich ist (siehe Kapitel 1.2.2). Der Effekt ist für die Zwei-Photonen-Anregung entscheidend, da sich damit die Leistung auf ein größeres Anregungsvolumen verteilt. Für ein Zwei-Photonen-Mikroskop kann die laterale Auflösung mit folgender Gleichung abgeschätzt werden [Zipfel, Williams und Webb, 2003]:

$$\delta r = \begin{cases} \frac{0.320\lambda}{\sqrt{2NA}} & NA \leq 0.7 \\ \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2NA^{0.91}}} & NA > 0.7 \end{cases} \quad (3.1)$$

Bei einer NA von 0,75 und einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 800$ nm ist die theoretische laterale Auflösung $\delta r = 240$ nm und bei einer NA von 0,6 $\delta r = 300$ nm. Die reale Auflösung für ein Zwei-Photonen-Mikroskop ist in der Regel allerdings bereits geringer als der theoretisch berechnete Wert. Der Effekt auf die Verschlechterung der lateralen Auflösung durch den Transport durch die einzelnen Fasern des Faserbündels ist zwar zu erwarten, allerdings mit diesen Messungen nicht abzuschätzen, da hier nur die Kombination von Anregung (Fasertransport) und Detektion (Faserabstand) bewertet werden kann. Für eine genauere Analyse des Einflusses des Fasertransports müsste der Fokussdurchmesser und die Intensitätsverteilung im Fokussdurchmesser z.B. mit einer speziellen Kamera vermessen werden. Da bei einem einzelfaserbasierten System die laterale Auflösung nur über die Auflösung der distalen Optik begrenzt ist, können mit solchen Systemen höhere laterale Auflösungen von ca. 1 μm [Engelbrecht u. a., 2008; Rivera u. a., 2011] erreicht werden, als mit einem faserbündelbasierten System.

Bei der Messung der axialen Auflösung mit einer dünnen fluoreszierenden Schicht ist zu beachten, dass die FWHM der Fluoreszenzantwort theoretisch etwas breiter ist als für eine Punktspreizfunktion (PSF, point spread function). Letztendlich werden in einem möglichen späteren medizinischem Einsatz fluoreszierende Zellschichten beobachtet. Für die Beurteilung der Dicke des detektierten Volumens ist daher die Fluoreszenzantwort einer dünnen fluoreszierenden Schicht gut geeignet. Sowohl für das Referenzsystem als auch für die Mikrooptik ist die axiale Auflösung mit einer FWHM von 3,5 μm bzw. 5,3 μm ausreichend, um innerhalb eines optischen Schnitts keine Überlagerung durch tiefer liegende Zellen zu erhalten. Die axiale Auflösung mit dem Referenzsystem (NA 0,75) ist allerdings deutlich schlechter als die theoretisch nach Zipfel, Williams und Webb [2003]

$$\delta z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left(\frac{1}{n_0 - \sqrt{n_0^2 - NA^2}} \right) \quad (3.2)$$

berechnete Auflösung von 900 nm ($\lambda_0 = 800$ nm, NA=0,75). Die mit der Mikrooptik erreichte axiale Auflösung ist im Vergleich zu anderen System sehr gut. Mit einem GRIN-Linsen-System aus einer NA von 0,2 und 0,5 wurde konfokal eine axiale Auflösung von 16,6 μm [Knittel u. a., 2001] gemessen und dem vergleichbaren Aufbau von Göbel u. a. [2004] von 20 μm . Das entspricht in etwa der axialen Auflösung von 21 μm , die

für das Referenzsystem mit einer vergleichbaren NA (NA=0,50) gemessen wurde. Für die Abweichung von der theoretischen Auflösung wurde in beiden Publikationen als mögliche Ursache Abbildungsfehler des GRIN-Linsen-Systems genannt. Diese Ursache sollte jedoch aufgrund des Vergleichs mit dem Referenzsystems überdacht werden. Da das Referenzsystem auf Mikroskopobjektiven basiert, können Linsenfehler vernachlässigt werden. Im Vergleich wurde bei einem einzelfaserbasiertem System von engelbrecht2008 mit einer NA von 0,5 eine axiale Auflösung von $7,7\text{ }\mu\text{m}$ gemessen. Möglicherweise spielt die Faserstruktur auch für die axiale Auflösung zumindest bei kleineren NAs eine Rolle. Dennoch scheinen derzeit GRIN-Linsen-Systeme eine noch vergleichsweise geringe axiale Auflösung zu ermöglichen. Durch die Verwendung von höheren objektseitigen NA (0,8, 0,82), die durch ein spezielles GRIN-Linsen-Design (siehe Abbildung 1.5) ermöglicht wurde, konnte eine axiale Auflösung von (12und10 μm) in einzelfaserbasierten Systemen erreicht werden [Barretto, Messerschmidt und Schnitzer, 2009; Rivera u.a., 2011]. Im Vergleich zu den hier vorliegenden Messungen ist die axiale Auflösung schlechter. Wahrscheinlich spielen bei größeren NA die Linsenfehler solcher GRIN-Linsen-Systeme eine zunehmende Rolle.

3.1.3 Transmission

Die Transmission des gesamten Aufbaus wurde für eine Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 800\text{ nm}$ und $\lambda_0 = 1040\text{ nm}$ gemessen. Die Transmission der einzelnen Komponenten ist in Tabelle 3.1 aufgezeigt. Für einen Aufbau ohne einen Gitterkompressor ergibt sich damit eine Gesamttransmission von 18 % ($\lambda_0 = 800\text{ nm}$) bzw. 5% ($\lambda_0 = 1040\text{ nm}$) bei Verwendung der Mikrooptik. Für das Referenzsystem ergibt sich eine Gesamttransmission von 11,5% ($\lambda_0 = 800\text{ nm}$) bzw. 3.7% ($\lambda_0 = 1040\text{ nm}$). Bei der Verwendung des Gitterkompressors wird die Transmission weiter verschlechtert. Zusätzlich verschlechtert bei Verwendung des Gitterkompressors die Effizienz der Faserkopplung. Damit ist die verfügbare Leistung an der Probe begrenzt. In Abbildung 3.4 ist die

	$\lambda_0 = 800\text{ nm}$	$\lambda_0 = 1040\text{ nm}$
Spiegel	95%	96%
Scanner	86%	84%
Einkoppeloptik	68%	48%
Faserkopplung	80%	82%
Mikrooptik	40%	16%
Referenzsystem	26%	12%
Gitterkompressor	45%	-

Tabelle 3.1 Transmission der einzelnen Komponenten

gemessene Transmission des verwendeten Einkoppelobjektivs gezeigt. Die Transmission von 400–700 nm wurde in einem Ulbrich-Kugel-Aufbau gemessen (Aufbau vergleiche Diplomarbeit Scheibe [2009]) und die Messung der Transmission bei $\lambda_0 = 800\text{ nm}$ und $\lambda_0 = 1040\text{ nm}$ eingefügt. Bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 1040\text{ nm}$ wurde zusätzlich zu der Transmission im Anregungspfad noch die Effizienz der Fluoreszenzkollektion in das

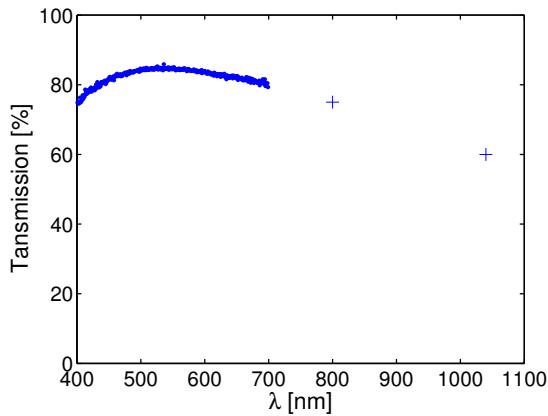


Abbildung 3.4 Transmissionskurve des Einkoppelobjektivs (20x, NA 0,4)

Faserbündel (IGN 08/30) für das Referenzsystem (NA 0,75) gemessen. Das Referenzsystem ermöglicht es, durch den Aufbau aus zwei Mikroskopobjektiven das Fluoreszenzlicht direkt mit Hilfe des Strahlteilers im kollimierten Strahlengang des Referenzsystems zu detektieren und damit mit der Fluoreszenzdetektion durch das Faserbündel zu vergleichen. Dazu wurde ein rot fluoreszierender Objekträger (Chroma Technology Corporation, Imtec Lane, Bellows Falls) verwendet. Das Chroma-Plättchen liefert bei gleicher mittlerer Leistung und gleicher Verstärkung des PMT eine konstante positionsunabhängige Fluoreszenzintensität. Da alle Komponenten bis auf die Position der Fluoreszenzkollektion unverändert sind, lässt sich daraus die Effizienz der Einkopplung des Fluoreszenzlichts in das Faserbündel zu 75% bestimmen.

3.1.3.1 Diskussion

Die Gesamttransmission liegt mit 18% trotz der Verluste bei der Fasereinkopplung im Bereich eines nichtkommerziellen Zwei-Photonen-Mikroskops mit 15% [Majewska, Yiu und Yuste, 2000]. Die Verluste vor allem in den Mikroskopoptiken nehmen mit längeren Wellenlängen im Naheninfraroten erheblich zu (siehe Abbildung 3.4) [Keller, 2006]. Bei einer Verwendung des Gitterkompressors und möglicherweise noch einer Messung der Autokorrelation (Transmission 45%) ist bei einer Ausgangsleistung des Ti:Sa-Laser von ca. 450 mW die verfügbare Leistung an der Probe auf ca. 5 mW begrenzt.

3.2 Variable Fokussiereinheit

3.2.1 Realisierung der Versuchsanordnung

Im Rahmen einer Bachelorarbeit von Judith Mittag wurden erste Versuche zur Nutzung eines Nitinoldrahts zur miniaturisierten Verstellung der Fokustiefe durchgeführt. Zur Analyse der Eigenschaften wurde ein Aufbau (siehe Abbildung 3.5) aus verschiedenen Stahlhülsen, eines Faserbündels und einer Mikrooptik (GRIN-Linsen-System) konstruiert (siehe Abbildung 2.11). Der Aufbau besitzt ohne die elektrische Ansteuerung des Nitinoldrahts einen Außendurchmesser von 4 mm. Eine Verkleinerung ist vor allem durch eine verbesserte elektrische Ansteuerung, eine verbesserte Isolierung und eine direkte Verklebung des Faserbündels mit der Mikrooptik möglich. In Experimenten im Rahmen der

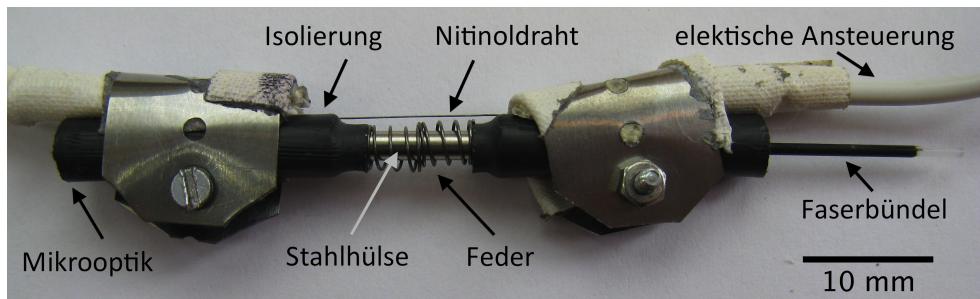


Abbildung 3.5 Aufbau Nitinol bestehend aus dem Faserbündel in einer Stahlhülse verklebt mit der Mikrooptik. An den äußeren Stahlhülsen mit der Isolierung ist der Nitinoldraht mit der elektrischen Ansteuerung befestigt. Die äußere Stahlhülse (Schlitten) bei der Mikrooptik ist frei beweglich, die äußere Stahlhülse ist fest mit der inneren Stahlhülse verbunden

Bachelorarbeit von Judith Mittag [Mittag, 2009] wurde zunächst eine Verstellung zwischen zwei Positionen untersucht. Innerhalb der Arbeit konnte gezeigt werden, dass damit eine stabile Verstellung möglich war. Für eine bildgebende Darstellung der Ergebnisse wurde mit diesem Aufbau die Verstellung durch das Faserbündel und das GRIN-Linsen-System aufgenommen. Dazu wurde das Faserbündel mit dem GRIN-Linsen-System in ein Konfokalmikroskop (Leica DM IRBE, Wetzlar) integriert. Die Einkopplung des Laserlichts in die einzelnen Faserkerne erfolgte mit einem 20x Objektiv (NA 0,5). Während der Spannungsapplikation von 0,42 V wurden konfokale Bilder aufgezeichnet. Die Spannung entspricht bei einem theoretischen Widerstand von $1,2 \Omega$ einer Stromstärke von 350 mA. Der Stromwert wurde in diesem Aufbau nicht gemessen. Die Spannung wurde zwischen dem zweiten und dritten Bildes angeschaltet und zwischen dem sechsten und siebten Bild wieder abgeschaltet. Als Objekt wurden Papierfasern, deren Autofluoreszenz mit Kresylviolett verstärkt wurde, beobachtet. Die Bilderserie der Papierfasern in Abbildung 3.6 zeigt, dass zwischen einer Position außerhalb des Fokus des GRIN-Linsen-Systems und einer stabilen Position innerhalb des Fokus eine Verstellung realisiert werden konnte. Die Aufnahme der Bilder erfolgte bei einer Bildwiederholrate von 0,6 Hz. Nach Beendung der Spannungsapplikation relaxiert das System in ca. 1,6 s (Zeit zwischen zwei Bildern).

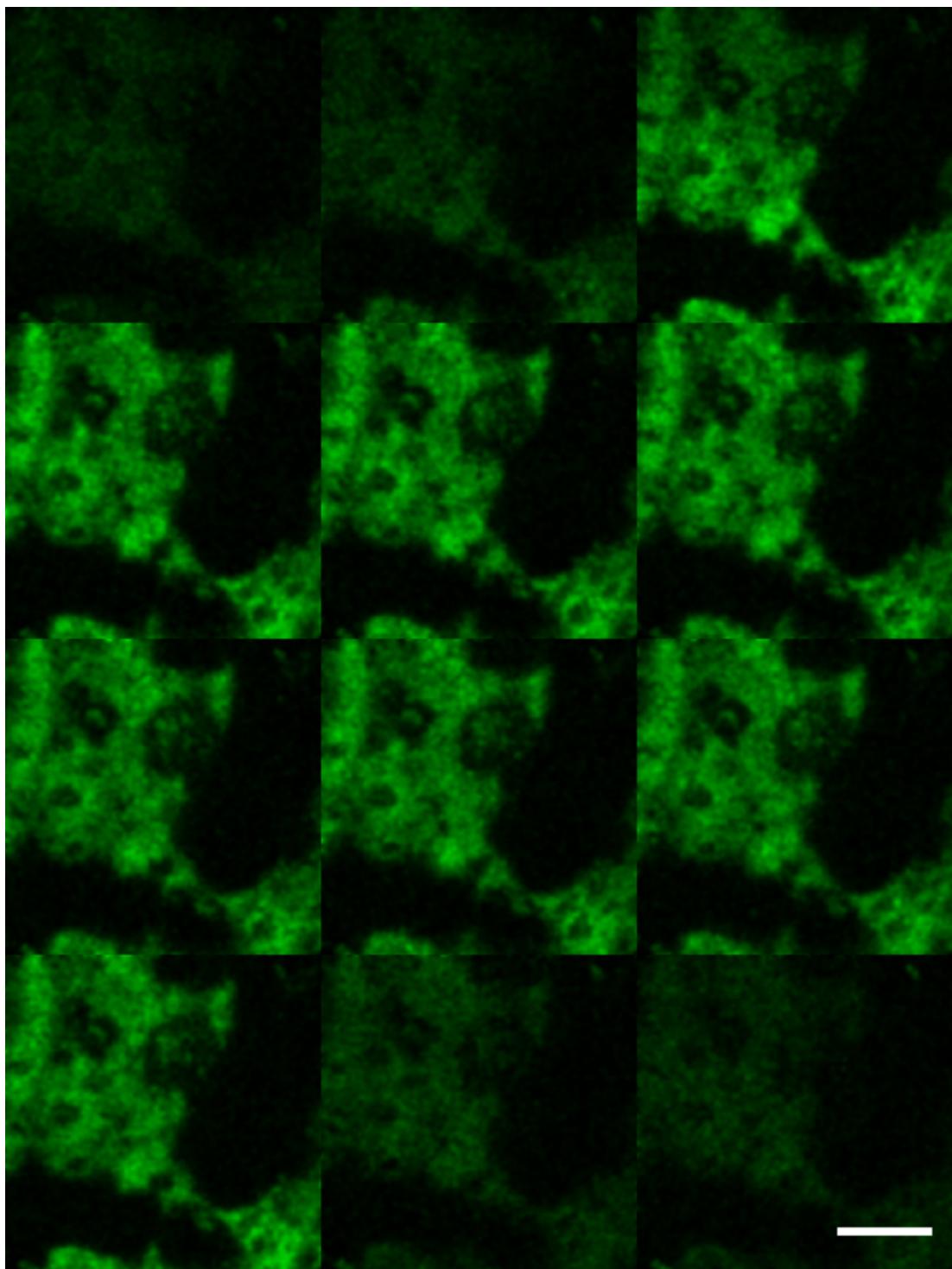


Abbildung 3.6 Verstellung Nitinol: Zeitserie konfokaler Bilder von Papierfasern bei Spannungsapplikation. Maßstab entspricht 50 μm

3.2.2 Bestimmung der Kontraktion des Nitinoldrahts

Zur Bestimmung der Kontraktion des Nitinoldrahts wurde in einem nächsten Schritt die Epifluoreszenzintensität eines Fluoreszenzstandards (siehe Material und Methoden

2.12.6) während der Kontraktion des Nitinoldrahts mit einer hohen zeitlichen Auflösung aufgenommen (siehe Material und Methoden 2.12.6). Abbildung 3.7 (a) zeigt die Fluoreszenzintensität als Funktion des mit dem Picomotor geänderten Abstands des Fluoreszenzstandards von dem Fokuspunkt der Mikrooptik. Mit Hilfe der so bestimmten Eichkurve kann die während der Kontraktion des Nitinoldrahts aufgezeichnete Fluoreszenzintensität in einen Abstand umgerechnet werden. Der Abstand des Fluoreszenzstandards vom Fokuspunkt wurde verändert, indem der Picomotor 50 bzw. 100 Schritte verfahren wurde und danach jeweils ein Fluoreszenzbild aufgenommen wurde. 50 bzw. 100 Schritte entsprechen einer zurückgelegten Strecke von 3,15 bzw. 6,3 μm . Das

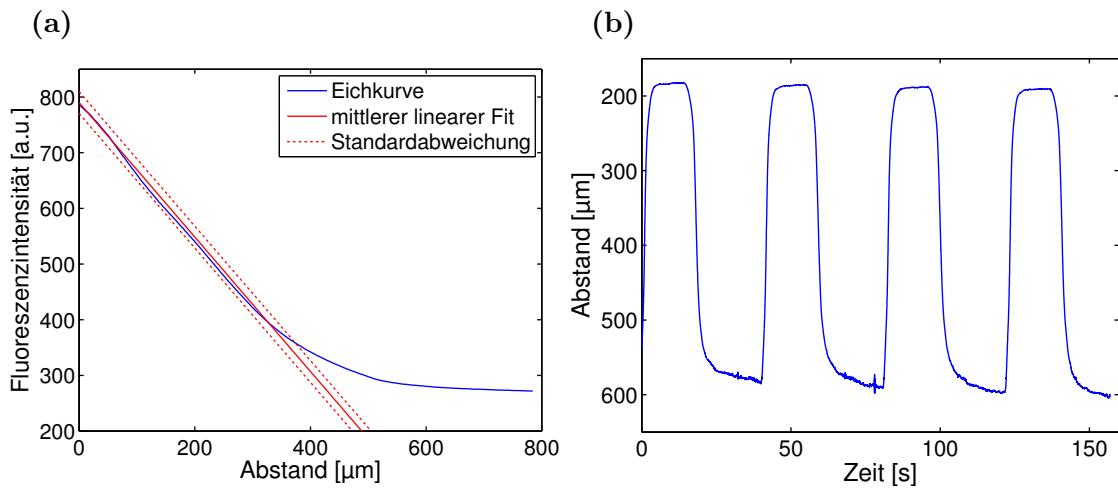


Abbildung 3.7 Eichkurve: (a) Der Abstand des Fluoreszenzstandards von dem Fokuspunkt der Mikrooptik ist gegen die Fluoreszenzintensität dargestellt (Eichkurve). Der Abstand wurde dazu mit dem Picomotor um 3,15 μm verstellt. Dargestellt ist eine von acht Eichkurven und die mittlere Steigung aller acht Eichkurven zusammen mit der Standardabweichung. Die mittlere Steigung beträgt $(-1,21 \pm 0,03)/\mu\text{m}$ ($n=8$). (b) kalibrierter Abstand des Fluoreszenzstandards während vier Spannungspulsen. Die maximale Verschiebung beträgt $(380+210/-5)\mu\text{m}$ bei einer Stromstärke von $((383 \pm 2)\text{ mA})$;

Maximum der Fluoreszenzintensität ist in der hier gezeigten Eichkurve nicht dargestellt und befindet sich bei einem Wert von 820 a.u.. Es wurden insgesamt acht Kalibrierfahrten durchgeführt. Dabei wurden sowohl positive Schritte als auch negative Schritte mit dem Picomotor ausgeführt, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

3.2.2.1 Bestimmung der maximalen Verstellung

Nach einer Interpolation der Eichkurve wurde die Fluoreszenzintensität in einen Abstand umgerechnet (siehe Abbildung 3.7 (b)). In Abbildung 3.7 (b) ist der interpolierte Abstand während vier Spannungspulsen aufgezeigt. Damit ergibt sich eine Änderung des Abstandes während der Kontraktion des Nitinoldrahts um $(380+210/-5)\mu\text{m}$ bei einem Stromwert von (383 ± 2) mA. Aufgrund der funktionalen Eigenschaften der Eichkurve ergeben sich bei der Bestimmung der absoluten Verstellung große Fehler. Dieser Fehler ist vor allem bei großen Abständen (d.h. einer kleinen Kontraktion) groß. Kleine Intensitätsschwankungen in den Eichkurven sind die Ursache dieser Fehler. Die absolute Verstellung wurde daher

auch in einem vergleichbaren Aufbau (Drahtlänge 43 mm) mit Hilfe einer Kameramessung (Progressive Scan Camera, CV-M10 RS, siehe Material und Methoden Abbildung 2.12.6) zu $1,8 \pm 0,2\%$ bestimmt.

3.2.2.2 Bestimmung der relativen Verstellung

Alle acht aufgenommen Eichkurven wurden durch einen linearen Fit angenähert. Dabei wurden nur die Werte in dem augenscheinlich linearen Bereich berücksichtigt, in Abbildung 3.7 (a) von 0–370 μm . Die Steigung der acht Eichkurven wurde gemittelt. Abbildung 3.7 (a) zeigt eine der acht Eichkurven zusammen mit der mittleren Steigung ($1,21 \pm 0,03$)/ μm und der Standardabweichung. Die Spannungsapplikation erfolgte in 10 s langen Pulsen (siehe Material und Methoden 2.12.5). Um eine Korrelation zwischen der Verstellung

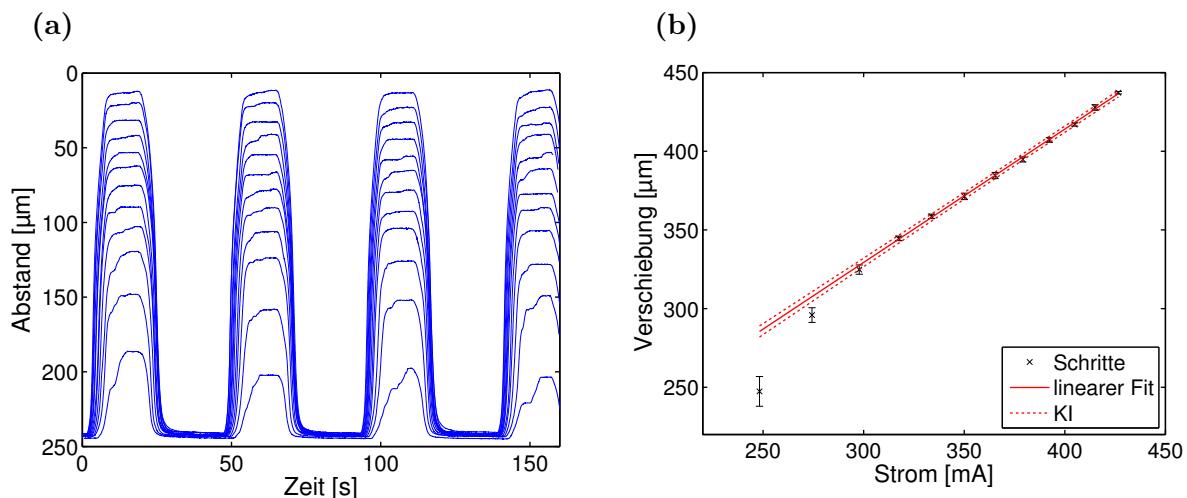


Abbildung 3.8 Verstellbarkeit der Fokussiereinheit (a) Die Verschiebung des Fluoreszenzstandards gegen die Aufnahmezeit (b) Maximum der ansteigenden Strompulse gegen den dazugehörigen Abstand. KI ist das Konfidenzintervall des linearen Fits im Bereich von 317 mA bis 427 mA.

und der Stärke der Spannungspulse zu ermitteln, wurde die Fluoreszenzintensität während verschieden starker Spannungspulsen gemessen (siehe Abbildung 3.8). Die Fluoreszenzintensität wurde mit der mittleren Steigung des linearen Fits der Eichkurve in einen Abstand umgerechnet. Da hier eine relative Verstellung gemessen werden soll, ist der Offset willkürlich gewählt. Durch eine Annäherung der Eichkurve mit einem linearen Fit werden vor allem Fehler bei großen Abständen des Fluoreszenzstandards vom Fokuspunkt gemacht. Abbildung 3.8 zeigt, dass ein stabiler Abstand ab einem Stromwert von 320 mA erreicht wird. Dies stimmt mit dem angegebenen Aktivierungsstrom von 330 mA (siehe Tabelle 2.8) überein. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität der Messung in Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 zeigt, dass ab diesem Stromwert auch der lineare Bereich der Eichkurve erreicht wird. Abbildung 3.8(b) zeigt ab Erreichen des Aktivierungsstroms einen linearen Zusammenhang zwischen der Stromstärke und der Verschiebung. Eine Änderung der Stromstärke in Schritten von 16–12 mA. ermöglicht eine Verschiebung von 20–10 μm .

3.2.2.3 Reproduzierbarkeit

Mit der Applikation von insgesamt 4×9 Spannungspulsen mit einem maximalen Stromwert von 370 mA wurde die Reproduzierbarkeit der Verstellung getestet. Abbildung 3.9 (a) zeigt die Veränderung des Abstands während der applizierten Spannungspulse. Die aufgenommenen Fluoreszenzintensität wurde wieder mit dem linearen Fit der Eichkurve in einen Abstand umgerechnet. Daraus kann eine gute Reproduzierbarkeit der Verstellung

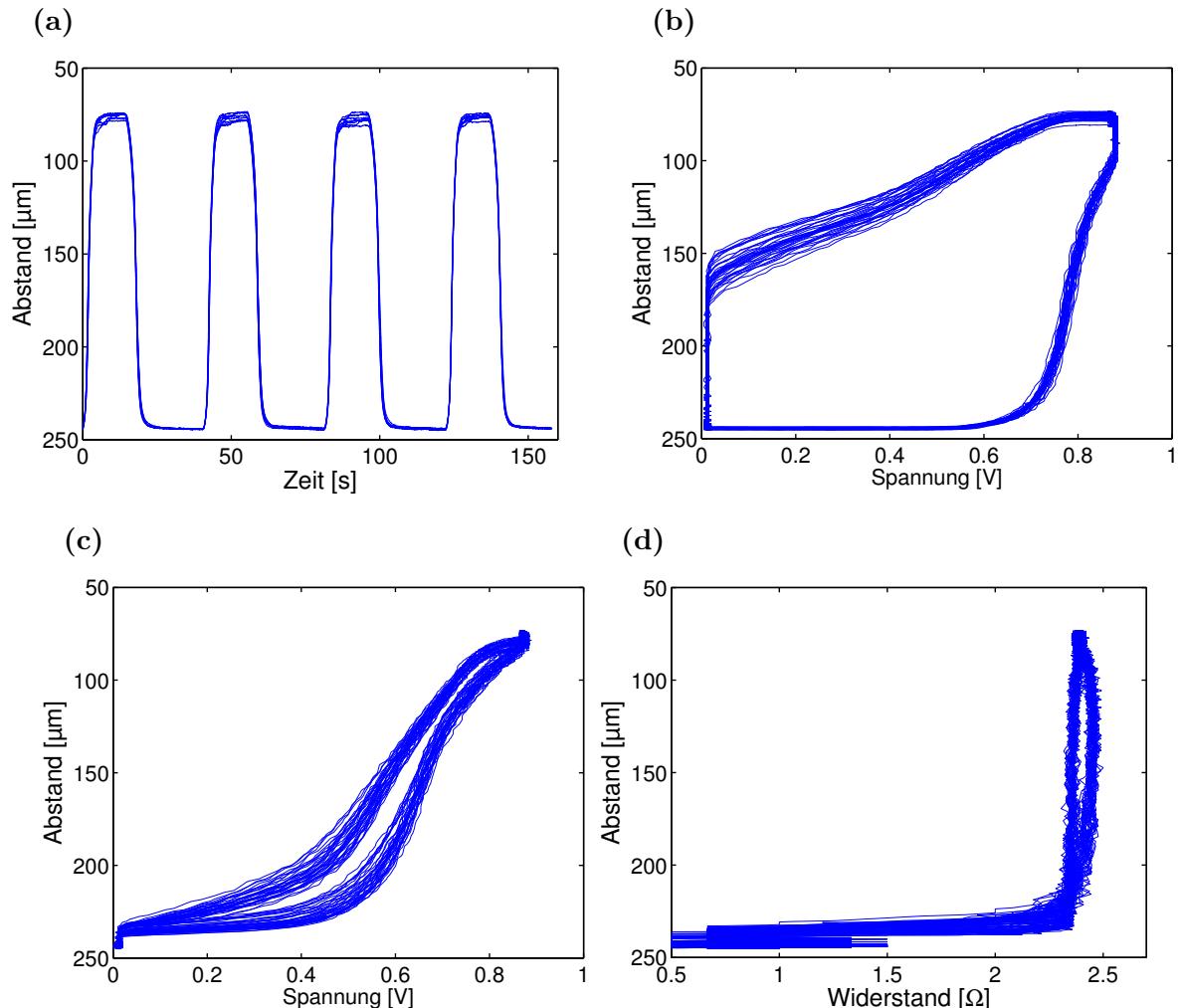


Abbildung 3.9 Reproduzierbarkeit der variablen Fokussiereinheit (a) 4×9 Synchronisierte Strompulse relativ zur Zeit in einem Plot mit der kalibrierten Verschiebung des Abstandhalters relativ zur Zeit (b) Strom-Spannungsrampe die an dem Nitinoldraht anliegt (c) Verschiebung relativ zur Spannung (d) Verschiebung relativ zum Widerstand

entnommen werden. Bei einer Darstellung der Spannung als Funktion des Abstands in Abbildung 3.9 (b) ist eine Verzögerung zwischen der Spannungsapplikation und der Verschiebung zu erkennen. Dieses Verhalten deckt sich mit den Experimenten von Judith Mittag. In Abbildung 3.9 (c) wurde ein zeitlicher Versatz von 2 s zwischen der Spannungsapplikation und der Aufnahme der Fluoreszenzintensität eingefügt. Sowohl Abbildung 3.9 (b) als auch Abbildung 3.9 (c) weisen eine Hysterese beim Aufwärmen

bzw. Abkühlen auf. Die Aufzeichnung des Widerstands in Abhängigkeit des Abstands (Abbildung 3.9 (d)) zeigt, dass sich der Widerstand erhöht bis eine Kontraktion des Nitinoldrahts einsetzt, während der Verstellung konstant bleibt und dann wieder kontinuierlich abnimmt. Dieser Vorgang ist für alle 36 Applikationen reproduzierbar. In dieser Abbildung wurde ebenfalls ein Zeitversatz zwischen der Aufnahme der Spannung und der Fluoreszenzintensität von 2 s eingefügt.

3.2.3 Diskussion

Der Einsatz von Nitinol bietet sich zum Bewegen von Objekten an, da sich Nitinol durch Erwärmen zusammenzieht und dabei Arbeit verrichten kann. Aufgrund des geringen Durchmessers (152 μm) des Nitinoldrahts kann dieser auch in miniaturisierten Aufbauten eingesetzt werden. Zudem besitzt Nitinol bereits eine breite Anwendung im medizinischen Bereich und die biologische Verträglichkeit ist getestet [Duerig, Pelton und Stöckel, 1999]. Eine Realisierung einer variablen Fokussiereinheit auf Basis von Nitinol erfüllt die meisten Anforderungen (siehe Tabelle 2.7). Problematisch ist lediglich der Einsatz von Strom am distalen Ende des Endoskops, um den Draht zu erwärmen und so die Kontraktion zu realisieren. Für eine medizinische Zulassung ist damit noch eine Isolierung der variablen Fokussiereinheit notwendig, um den Anforderungen an den Leckstrom einzuhalten. Am Laser-Forschungslabor werden aber derzeit Konzepte untersucht, um eine Erwärmung von Nitinol mit Laserlicht zu realisieren.

In dieser Arbeit wurde ein Aufbau realisiert, bei dem die Kontraktion des Nitinoldrahts den Abstand zwischen der Mikrooptik und der Gewebeoberfläche verkleinert. Durch die Variation des Arbeitsabstand können somit unterschiedlich tiefe Schichten im Gewebe angefahren werden. In einem konfokalen faserbündelbasierten Aufbau konnte so zwischen einer scharfen und einer unscharfen Position geschaltet werden. Mit der Beobachtung der Epifluoreszenz eines Fluoreszenzstandards durch das Faserbündel ist es gelungen, die Kontraktion des Nitinoldrahts mit hoher zeitlicher Auflösung (36 Hz) zu beobachten. Zusätzlich konnten gleichzeitig die elektrischen Eigenschaften des Nitinoldrahts gemessen werden. Mit diesen Messungen ist jedoch die Bestimmung einer absoluten Verstellung stark fehlerbehaftet, da kleine Schwankungen in der minimalen Fluoreszenzintensität bei der Aufnahme der Eichkurve bereits einen großen Einfluss auf den interpolierten Abstand besitzen. Bei einer Stromapplikation von $(383 \pm 2) \text{ mA}$ ergibt sich eine Verstellung von $(380 \pm 210/-5) \mu\text{m}$. Die Methode eignet sich somit nicht um eine maximale Verstellung zu bestimmen. Gemäß der Eigenschaften von Nitinol ist mit einer Verschiebung von 3% zu rechnen. Ma, Song und Lee [2004] erreichen mit einem ähnlichen Konzept (Feder und Nitinoldraht) bei einer Drahtlänge von 228,6 mm eine Verschiebung von ca. 3,7%. In Experimenten mit einem vergleichbaren Aufbau [Mittag, 2009] konnte eine Verschiebung von $1,8 \pm 0,2\%$ gemessen werden. Bei der verwendeten Drahtlänge von 26,5 μm entspräche das einer Verstellung von $(480 \pm 10) \mu\text{m}$. Dieses Ergebnis ist mit den hier dargestellten Ergebnissen vereinbar. Wu u. a. [2010] erreichen mit ihrer variablen Fokussiereinheit auf Basis von Nitinol eine Verschiebung von 1,5% bei einer Drahtlänge von ca. 10 mm.

Es konnte gezeigt werden, dass ab Erreichen des Aktivierungsstroms von 330 mA bei Verwendung von Strompulsen durch eine Änderung der maximalen Stärke der Strompulse der Abstand schrittweise geändert werden kann. Allerdings ist damit eine Verstellung auf die Ausgangsposition notwendig, bevor die nächste Position angefahren werden kann.

Weiterhin konnte eine gute Reproduzierbarkeit in der Positionierung gezeigt werden. In dem Verlauf der Spannung als Funktion des Abstands (Abbildung 3.9 (b) und (c)) zeigte der Nitinoldraht eine Trägheit bei der Spannungsapplikation. Das bedeutet, dass nach dem Anlegen einer Spannung sich der Draht erst nach ca. $(2,0 \pm 0,5)$ s erwärmt. Ein Problem in der Synchronisation konnte ausgeschlossen werden, da der Draht ein vergleichbares Verhalten in vorherigen Experimenten [Mittag, 2009] zeigte, bei dem eine andere Art der Synchronisation verwendet wurde. Der Zeitshift in der Applikation und Kontraktion von $(2,0 \pm 0,5)$ s liegt im Bereich der Kontraktionszeit des Nitinoldrahts von 1 s. Bei den Experimenten zeigte sich eine erwartete Hysterese in der Spannung als Funktion des Abstands (siehe Abbildung 3.9 (c)) zwischen der Erwärmung und der Abkühlung des Nitinoldrahts. Probleme ergeben sich damit vor allem, wenn die Spannung kontinuierlich verändert wird, da dann beim Hinweg andere Positionen erreicht werden als beim Rückweg. Eine Lösung dieses Problems wurde von Ma, Song und Lee [2004] vorgeschlagen. Dort wird der Widerstand des Nitinoldrahts als Feedback-Mechanismus genutzt, um gleiche Positionen beim Erwärmen und Abkühlen zu erhalten. Ein Vergleich der Abbildung 3.9 (c) und (d) mit Abbildung 3 und 4 von Ma, Song und Lee [2004] zeigt, dass der Verlauf der Kurven zum Teil reproduziert werden konnte. Eine Abweichung ist vor allem durch den Fehler der Bestimmung des Abstands durch einen linearen Fit der Eichkurve zu erklären. Prinzipiell sollte sich daher der von Ma, Song und Lee [2004] verwendete Ansatz auch für einen endoskopischen Einsatz eignen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Spannungspulsen mit einer unterschiedlichen Spannung ebenfalls eine Änderung des Abstandes erreicht werden kann. Daher ist es fraglich, ob der von Ma, Song und Lee [2004] betriebene Aufwand notwendig ist. Insgesamt ist damit die Anforderung auf das Potenzial zur 3D-Darstellung gegeben.

Wu u. a. [2010] verwenden in ihrem Aufbau einen Nitinohldraht mit einem kleineren Durchmesser ($76 \mu\text{m}$). Der Vorteil dieses Drahts ist, dass die benötigten Ströme und Spannungen kleiner sind. Dafür kann der Draht weniger Arbeit verrichten. In diesem Aufbau konnte durch die Verwendung eines Nitinoldrahts mit einem größeren Durchmesser daher stärkere Federn verwendet werden. Der Aufbau ist somit weniger anfällig auf Druck von außen. Ein Nachteil des hier verwendeten Konzepts, bei dem der Abstand der Mikrooptik zum Gewebe verändert wird, ist, dass durch zuviel Druck auf das eingebaute Glasfenster ein Einfluss auf die Verstellung ausgeübt wird. Als Verbesserung könnte daher eine spezielle Optik entwickelt werden, mit Hilfe der die Fokussierung verstellt werden kann. Die hier vorgestellte Verstellung könnte aber ebenfalls dafür verwendet werden.

3.3 Pulspagation

Die Untersuchungen der Wechselwirkung der Laserpulse mit dem Faserkernmedium eines Lichtwellenleiters bilden eine wesentliche Grundlage, um ein Zwei-Photonen-Endoskop erfolgreich aufzubauen zu können. Das Ziel dabei ist es, die Pulsdauer am Faserausgang möglichst kurz zu halten, um die Peakintensität für eine effektive Zwei-Photonen-Anregung zu maximieren. In den folgenden Kapiteln sollen daher diese Wechselwirkungen genauer untersucht und gemessen werden, sowie Maßnahmen zur Optimierung der Pulsdauer am Faserausgang vorgestellt werden. Die Messungen wurden zu einem großen Teil im Rahmen einer Diplomarbeit von Andreas Delker [Delker, 2010] durchgeführt. Für die in diesem Kapitel beschriebenen Messungen wurde der Ti:Sa-Laser verwendet.

3.3.1 Laserparameter

Die Laserparameter, die Pulsdauer τ_p , die Zentralwellenlänge λ_0 , die spektrale Breite $\Delta\lambda$ und die Repetitionsrate sind wichtige Eingangsparameter, die einen Einfluss auf die Pulsausbreitung haben. Die hier gemessenen Größen wurden in Kapitel 1.3.2.2 theoretisch beschrieben. Die Laserparameter wurden bei den Zentralwellenlängen $\lambda_0 = 800\text{ nm}$ und $\lambda_0 = 825\text{ nm}$ gemessen, und die Zeit-Bandbreite-Produkte (TWP) für verschiedene Einstellbereiche (minimale bzw. maximale Pulsdauer) bestimmt (siehe Tabelle 3.2). Die

Zentralwellenlänge λ_0	Pulsdauer: τ_p	Pulsbreite: $\Delta\lambda$	TWP
800 nm	$83 \pm 3\text{ fs}$	$10 \pm 1\text{ nm}$	$\tau_p \Delta\nu_p = 0,40 \pm 0,09$
800 nm	$160 \pm 6\text{ fs}$	$6 \pm 1\text{ nm}$	$\tau_p \Delta\nu_p = 0,43 \pm 0,10$
825 nm	$94 \pm 3\text{ fs}$	$11 \pm 1\text{ nm}$	$\tau_p \Delta\nu_p = 0,45 \pm 0,09$
825 nm	$147 \pm 6\text{ fs}$	$6 \pm 1\text{ nm}$	$\tau_p \Delta\nu_p = 0,40 \pm 0,09$

Tabelle 3.2 Vergleich der Laserparameter bei den Zentralwellenlängen $\lambda_0 = 800\text{ nm}$ und 825 nm mit den dazugehörigen Zeit-Bandbreite-Produkten (TWP)

Pulsdauer wird im Folgenden unter der Annahme von gaußförmigen Pulsen angegeben, da nach einer Anpassung der Autokorrelation mit einer Gaußkurve eine kleinerer Quadratsumme der Fehler im Vergleich zu einer Anpassung der Autokorrelation mit einem Sech²-Profil (siehe Tabelle 1.2) festgestellt wurde (siehe Abbildung 3.10). In Abbildung 3.11 ist (a) die Autokorrelation und (b) das Spektrum bei $\lambda_0 = 800\text{ nm}$ für die kürzeste und längste Pulsdauer zu sehen. Die gezeigte Autokorrelation wurde bereits durch den Faktor $\sqrt{2}$ geteilt, in der Annahme eines Gaußprofils (siehe Material und Methoden 2.9). Aus diesen Messungen wurde τ_p und $\Delta\nu_p = c\Delta\lambda/\lambda_0^2$ bestimmt (c = die Lichtgeschwindigkeit). Eine Anpassung durch eine Gaußkurve und die daraus erhaltene Pulsdauer, sowie die direkte Bestimmung der Halbwertsbreite (FWHM) liefern im Rahmen der Fehler gleiche Ergebnisse. Eine fehlende thermische Stabilisierung des Ti:Sa-Lasers führte zu kleinen Schwankungen in der Pulsdauer τ_p ($\pm 20\text{ fs}$), der spektralen Breite $\Delta\lambda$ ($\pm 4\text{ nm}$) und der Zentralwellenlänge λ_0 ($\pm 1\text{ nm}$).

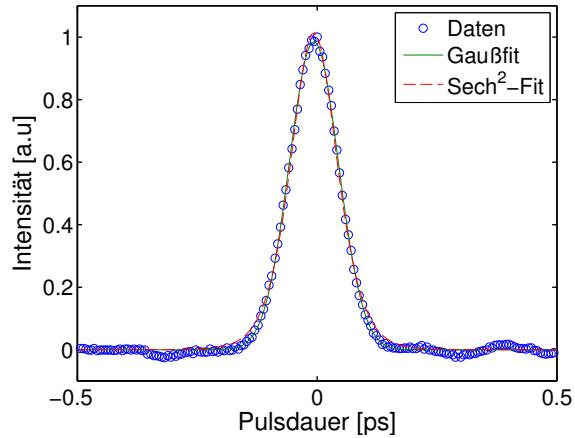


Abbildung 3.10 Vergleich eines Gaußfits mit einem Sech²-Fit einer Autokorrelation. Die FWHM der Autokorrelation entspricht (120 ± 1) fs. Die Breite der Autokorrelation entspricht mit einem Gaußfit (121 ± 1) fs, das entspricht einer Pulsdauer von 85 fs. Mit einem Sech²-Fit entspricht die Breite der Autokorrelation 113 fs und damit einer Pulsdauer von 73 fs. Die Quadratsumme der Fehler des Gaußfits beträgt $0,031 \text{ fs}^2$ und des Sech²-Fits $0,051 \text{ fs}^2$

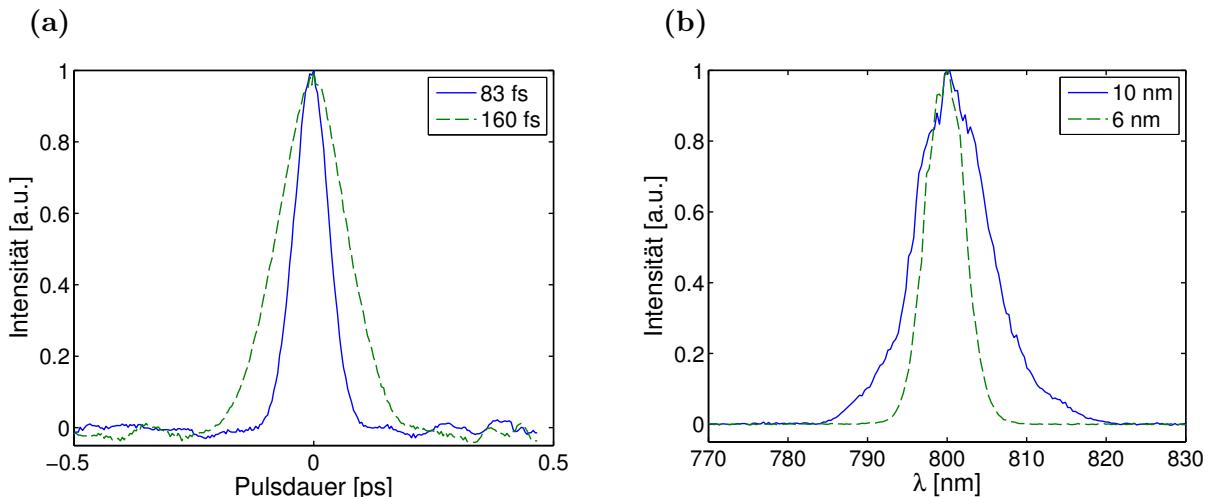


Abbildung 3.11 Autokorrelation und Spektrum der Laserpulse

3.3.2 Diskussion

Die Messungen zeigen, dass der Ti:Sa-Laser nahezu Fourier-limitierte Pulse erzeugen kann, dies ist jedoch auch von der Justage des Lasers abhängig. Fourier-limitierte Pulse sind für spätere Simulationen eine gute Ausgangsbasis, da die Ursache von nicht Fourier-limitierten Pulsen vielfältig sein kann und damit mögliche Fehlerquellen reduziert werden können. Die Messungen zeigen aber auch, dass die spektrale Breite der Pulse je nach Einstellung variieren kann. Die spektrale Breite kann vor allem bei der Wechselwirkung mit Materie einen Einfluss auf die Pulsdauer nach dem Durchgang durch die Materie haben. Der mögliche Einfluss auf die Ergebnisse wird später in diesem Abschnitt mit Hilfe von Simulationen untersucht (siehe Kapitel 3.3.5.4). Durch eine fehlende thermische Stabilisierung war teilweise zwischen den Messungen eine Nachjustierung notwendig, da

während der Messung die Modenkopplung nicht stabil war. Eine leichte Veränderung der spektralen Breite während einer Messreihe ist somit nicht auszuschließen.

Ein weiterer Eingangsparameter ist das zeitliche Profil der Laserpulse. Die Messung des zeitlichen Profils der Laserpulse ergab eine bessere Übereinstimmung mit einem Gaußprofil als mit einem Sech²-Profil, da das berechneten TWP (siehe Tabelle 3.2) und ein Fit des zeitlichen Profils eine besser Übereinstimmung mit einem Gaußprofil zeigen. Allerdings ist das vom Hersteller angegebene Profil des Ti:Sa-Laser ein Sech²-Profil und weist somit auf ein suboptimales Verhalten des Lasers hin. Das hier gemessene TWP ist teilweise kleiner als das theoretisch minimale TWP von 0,441 für Gaußpulse. Da dies theoretisch nicht möglich ist, handelt es sich bei dem Profil um kein reines Gaußprofil. In der Praxis ist das tatsächliche Laserprofil häufig eine Mischung aus einem Gauß- und Sech²-Profil. Daher kann eigentlich nur eine bessere Übereinstimmung mit einem Gaußprofil geschlussfolgert werden. Bei den Simulationen und Berechnungen hat die Wahl des Eingangsprofils einen Einfluss auf die angegebene Pulsdauer. In Abbildung 3.10 ist nur ein kleiner Unterschied in der Pulsform erkennbar. Der Einfluss der Modelle und der Angaben der Pulsdauer haben hier einen größeren Einfluss.

3.3.3 Pulspropagation ultrakurzer Pulse durch Lichtwellenleiter

Zum Verständnis der Effekte, die bei der Wechselwirkung der Pulse mit dem Faserkernmaterial auftreten, ist es zunächst wichtig, die Ausbreitungseigenschaften der Pulse innerhalb der Faser zu untersuchen. Bei der Ausbreitung gibt es zwei Effekte, zum einen die linearen und die nichtlinearen Effekte, die zu einer Pulsverbreiterung führen (siehe Theorie 1.3.4). Durch die nichtlineare Dispersion kommt es durch die Selbstphasenmodulation vor allem auf den ersten Zentimetern der Ausbreitung zu einer Verbreiterung des Spektrums und damit zu einer Verlängerung der Pulsdauer [Clark, Ilday und Wise, 2001]. Das bedeutet, dass die Verlängerung der Pulsdauer nicht nur von der Länge der Faser, sondern auch von der Leistung im Faserkern abhängt. Bereits ab einer Leistung von 1 mW ist mit einer Pulsverbreiterung aufgrund von nichtlinearen Effekten zu rechnen. Dies ist vor allem für die Konstruktion des geplanten Pulskompressors wichtig, da auch die nichtlinearen Effekte eine Auswirkung auf den optimalen Abstand zwischen den Gittern haben (siehe Abschnitt 3.3.5.5).

3.3.3.1 Verbreiterung der Pulsdauer

Abbildung 3.12 zeigt die Autokorrelation am Faserausgang zweier verschiedener Fasern, einmal der Monomodefaser und einmal einer einzeln adressierten Faser des Drei-Glas-Faserbündels. Die Eigenschaften der verschiedenen Fasern sind in Tabelle 2.3 gezeigt. Die Autokorrelation zeigt einen Doppelpeak. Die Pulsdauern von 1,0 ps für die Monomodefaser und 2,6 ps für das Drei-Glas-Faserbündel wurden zum einen durch eine Anpassung mit einer Gaußkurve und zum anderen über eine Bestimmung der Halbwertsbreite der Autokorrelation angegeben. Beide Methoden liefern im Rahmen der Fehler ein übereinstimmendes Ergebnis. Für das Zwei-Glas-Faserbündel (IGN 06/17) ergab sich eine Pulsdauer von 300 fs bei einer Faserlänge von 5 cm und einer Leistung von 10 mW. Bei einer Länge von 26 cm ergab sich eine Pulsdauer von 1 ps mit gleichen Einstellungen. Die Eingangspulsdauer betrug 100 fs.

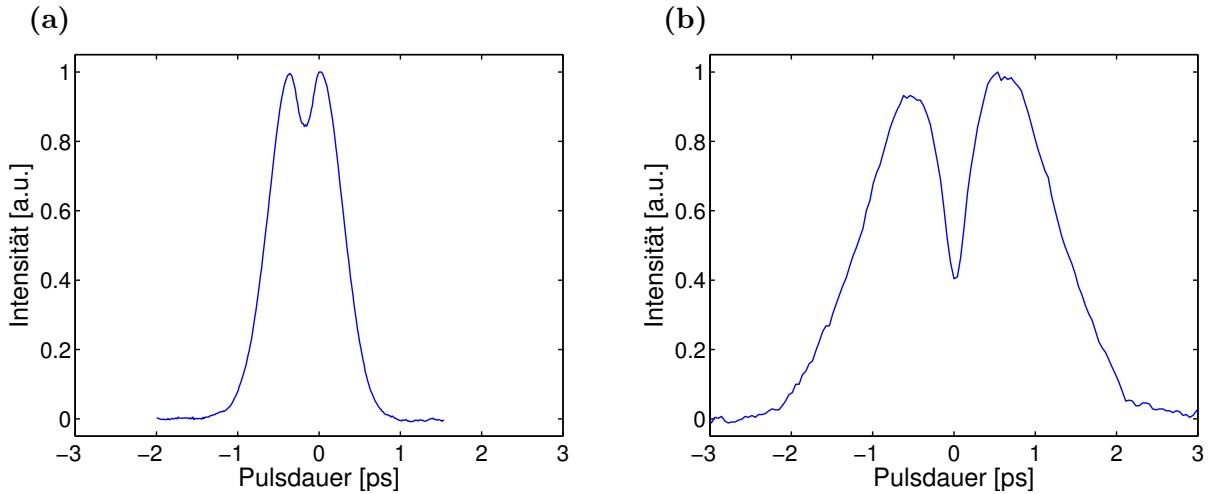


Abbildung 3.12 Autokorrelation am Faserausgang (a) einer 65 cm langen Monomodefaser bei einer mittleren Leistung von 20 mW. Die Eingangspulsdauer betrug 130 fs, die Ausgangspulsdauer 1,0 ps (b) Autokorrelation am Faserausgang eines 64 cm langen Drei-Glas-Faserbündels bei einer mittleren Leistung von 21 mW. Die Eingangspulsdauer betrug 100 fs, die Ausgangspulsdauer 2,6 ps

3.3.3.2 Verbreiterung des Spektrums

Ein Maß für die Selbstphasenmodulation ist vor allem die spektrale Verbreiterung der Pulse. In Abbildung 3.13 ist das Spektrum der Pulse nach verschiedenen Fasern zu sehen. Ein Vergleich der Fasern bei einer Ausgangsleistung von 40 mW am Faserende ergibt für die Monomodefaser eine spektrale Breite von 13 nm, für das Drei-Glas-Faserbündel eine Breite von 27 nm und für das Zwei-Glas-Faserbündel eine Breite von 15 nm. Die Länge der Fasern betrug je nach Verfügbarkeit im Fall der Monomodefaser 11 cm, im Fall des Drei-Glas-Faserbündels 64 cm und im Fall des Zwei-Glas-Faserbündels 5 cm. Auch bei einer mittleren Leistung von 10 mW wurde eine spektrale Verbreiterung der Pulse gemessen. Da bei der Messung mit dem externen Sensor des Autokorrelators (siehe Material und Methoden 2.9) die Leistung halbiert wird, ist eine gleichzeitige Messung der Autokorrelation nur bis zu 20 mW möglich.

3.3.3.3 Diskussion

Verbreiterung der Pulsdauer

Die Messung der Pulsdauer am Faserausgang zeigt, dass im Fall der Monomodefaser bereits nach 64 cm die ursprüngliche Pulsdauer von 100 fs auf eine Pulsdauer von 1,0 ps angewachsen ist. Die zeitliche Verbreiterung der Pulse kann theoretisch mit Hilfe der GDD (siehe Kapitel 1.3.4.1) abgeschätzt werden. Die nichtlinearen Effekte werden dabei allerdings nicht berücksichtigt. Für eine Glasstrecke von 64 cm ergibt sich eine theoretische GDD von $23\,000\,\text{fs}^2$ (SQ1, $d^2n/d\lambda_0^2 = 0,039\,88/\mu\text{m}^2$ bei 800 nm, siehe Gleichung 1.34). Eine entsprechende GDD ergibt mit Hilfe der Formel aus Gleichung 1.37 am Faserausgang eine Pulsdauer von 620 fs ($\lambda_0 = 800\,\text{nm}$, $\Delta\lambda = 9\,\text{nm}$). Bei einer Einzelfaser des Drei-Glas-Faserbündels wurde eine Pulsdauer von 1,9 ps bei einer mittleren Leistung

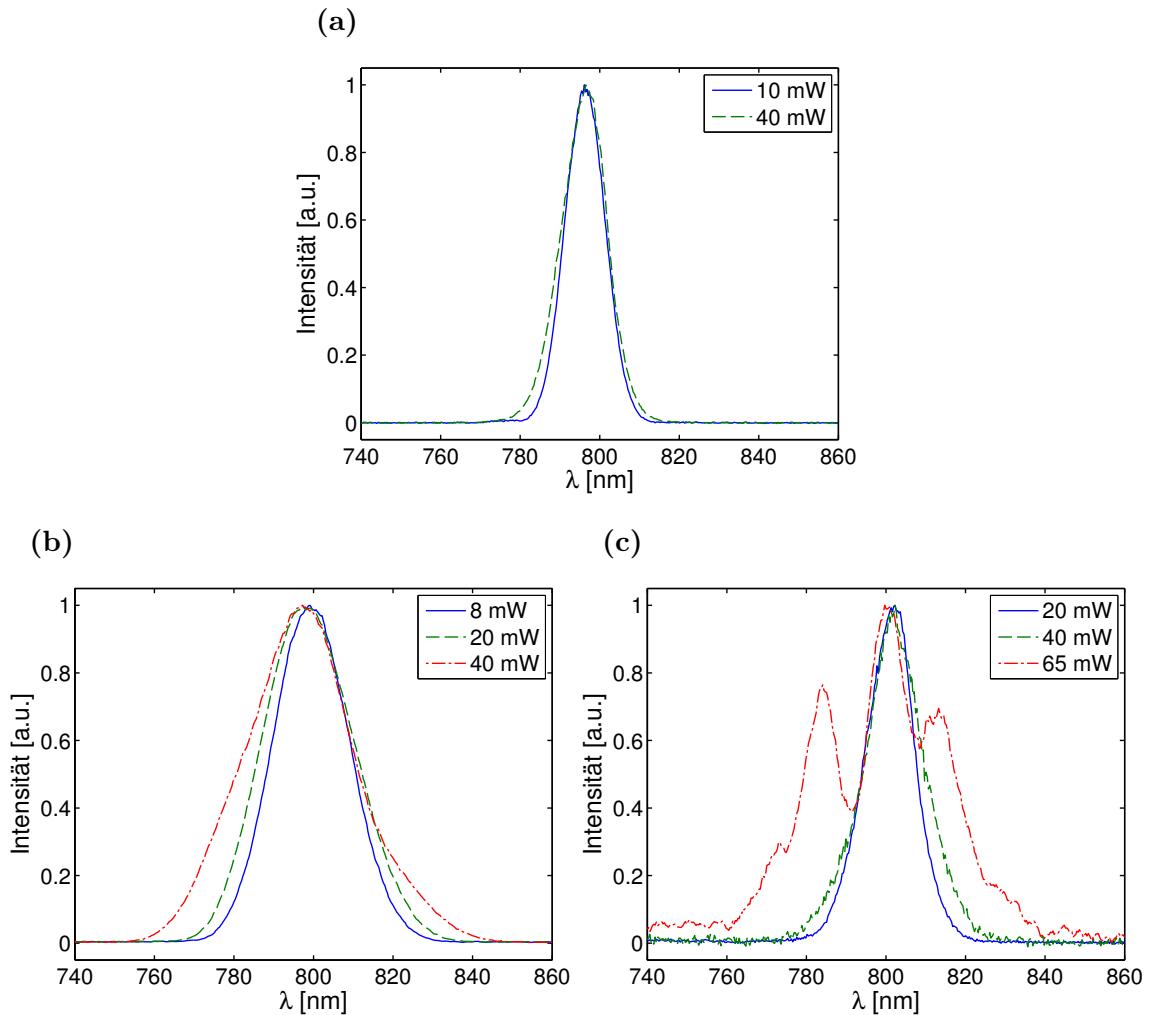


Abbildung 3.13 Spektrum ungechirpter Pulse am Faserausgang einer (a) Monomodefaser (Länge 11 cm) (b) einer einzeladressierten Faser eines Drei-Glas-Faserbündels (Länge 64 cm). (c) einer einzeladressierten Faser eines Zwei-Glas-Faserbündels (Länge 5 cm) bei verschiedenen Leistungen. Die spektrale Breite der Eingangspulse betrug 9 nm.

von 8 mW gemessen. Mit der Annahme, dass der Faserkern dem Material BK7 ähnlich ist, ergibt sich eine theoretische GDD von $32\,000\,\text{fs}^2$ (BK7, $d^2n/d\lambda_0^2 = 0,055\,89/\mu\text{m}^2$ bei 800 nm). Das entspricht einer Ausgangspulsdauer von ca. 850 fs. Die gemessenen Pulsdauern sind damit wesentlich länger als die theoretische Abschätzung der Pulsdauer mit Hilfe der GDD. Zusammen mit der gemessenen spektralen Verbreiterung lässt sich folgern, dass eine Messung der Pulsdauer am Faserausgang ohne den Einfluss der Selbstphasenmodulation nicht möglich ist, da bereits bei relativ geringer Leistung (ca. 1 mW) die genannten Effekte auftreten. Bei den Experimenten würde eine Trennung zwischen den linearen und nichtlinearen Effekten mehr Aufschluss z.B. über den Anteil der einzelnen Effekte und damit auch über den Einfluss bzw. die Art des Fasermaterials geben. Während der Messung der Autokorrelationen zeigte sich nach einer Glassstrecke von 64 cm sowohl bei Verwendung einer Monomodfaser als auch bei der Messung an dem Drei-Glas-Faserbündel ein Doppelpeak. Das Auftreten eines Doppelpeaks ist nicht zu

erwarten. Diese ungewöhnliche Form Autokorrelation lässt schwer einen Rückschluss auf den tatsächlichen zeitlichen Pulsverlauf zu. Auch in Wiederholungen der Experimente wurde diese Form mehrfach bestätigt. Nach Rücksprache mit dem Hersteller des Autokorrelators, APE, konnten Messfehler durch eine falsche Einstellung ausgeschlossen werden. Da diese Form nicht nur bei der Messung mit dem Drei-Glas-Faserbündel sondern auch mit der Monomodefaser auftraten, wurden Effekte durch Modendispersion in der Faser als Ursache ausgeschlossen. Da sich der Doppelpeak bei zunehmender Leistung verbreitert, ist eine mögliche Erklärung, dass durch die nichtlinearen Effekte eine Struktur in der Pulsform einen Doppelpeak in der Autokorrelation hervorruft. Für eine genaue Analyse der Ursache sollten weitere Pulsparameter, wie z.B. die zeitliche Phase der Pulse gemessen werden. Dafür sind allerdings weitere Messmethoden notwendig, die für diese Arbeit nicht zur Verfügung standen. Eine Trennung der Beiträge der linearen Dispersion und der nichtlinearen Dispersion wäre z.B. durch die Verwendung von geringeren mittleren Leistungen möglich. Allerdings ist dies experimentell schwierig, da z.B. die Empfindlichkeit der Sensoren verbessert werden müsste. Für eine genaue Vorhersage der benötigten Eigenschaften eines Pulskompressors wäre solch eine Trennung allerdings hilfreich. Dies zeigt sich später bei der Untersuchung der Eigenschaften des Pulskompressors (siehe Kapitel).

Verbreiterung des Spektrums

Für die Verbreiterung des Spektrums ist vor allem die Selbstphasenmodulation verantwortlich. Stolen und Lin [1978] beobachteten als eine der Ersten die Selbstphasenmodulation in Fasern aus Quarzglas. Dort ist die charakteristische Ausbildung von weiteren Peaks in den Flanken der spektralen Komponenten bei zunehmender Leistungsdichte gezeigt. Eine vergleichbare Messung ist in Abbildung 3.13 (c) bei einer Leistung von 65 mW zu sehen. Für die anderen Fasern war wahrscheinlich die mittlere Leistung am Fasereingang noch zu gering, um eine Ausbildung von Peaks in den Flanken zu verursachen, oder sie sind aufgrund der längeren Faserstrecke nicht mehr sichtbar, da sich die Form der Peaks in den Flanken während der Ausbreitung der Pulse verändert. Eine Messung bei noch höheren Leistungen war aufgrund von Rückreflexionen an der Faserendfläche nicht möglich. Die Rückreflexionen führten zu einer Störung der Modenkopplung im Ti:Sa-Laser. Verschiedene Maßnahmen, wie das schräge Anschleifen der Faser oder die Verwendung eines Immersionsmediums zwischen dem Einkoppelobjektiv und der Faser, konnten die Rückreflexionen nicht merklich vermindern. Bei den Messungen am Zwei-Glas-Faserbündel ist eine stabile Einkopplung in eine einzelne Faser schwierig. Dabei spielen zwei Parameter zur Kontrolle eine wichtige Rolle, zum einen die mittlere transmittierte Leistung und zum anderen die Beobachtung der spektralen Breite. Ab einer Leistung von 50 mW konnte eine Zunahme anderer spektraler Komponenten um eine Wellenlänge von 530 nm beobachtet werden. Die Monomodefaser zeigt, wie zu erwarten, die geringste spektrale Verbreiterung aufgrund des größeren Faserkerndurchmessers im Vergleich zu den anderen Fasern. Das Zwei-Glas-Faserbündel zeigt eine geringfügig kleinere Selbstphasenmodulation als das Drei-Glas-Faserbündel. Im Rahmen der Messfehler ist dieser Unterschied zu vernachlässigen. Allerdings ist die Einzeladressierung im Fall des Drei-Glas-Faserbündels wesentlich einfacher, da der Abstand der Faserkerne größer ist als beim Zwei-Glas-Faserbündel. Im Vergleich zu dem

regelmäßigen Durchmesser der Faserkerne bei dem Drei-Glas-Faserbündel variiert der Durchmesser der Faserkerne in dem Zwei-Glas-Faserbündel stärker (siehe Abbildung 2.5). Der Durchmesser beeinflusst bei gleicher transmittierter mittlerer Leistung die Leistungsdichte innerhalb des Faserkerns und damit die Stärke der nichtlinearen Effekte. Die Faserkerndurchmesser des Drei-Glas-Faserbündels und des Zwei-Glas-Faserbündels sollte laut Herstellerangaben (siehe Material und Methoden 2.5) annähernd gleich sein. Mikroskopische Durchlichtaufnahmen der Faserbündel zeigen jedoch, dass der Faserkerndurchmesser des Drei-Glas-Faserbündel etwas größer ist als des hier verwendeten Zwei-Glas-Faserbündels. Zusammen mit der vergleichbaren spektralen Verbreiterung bei beiden Faserbündeln lässt sich damit abschätzen, dass wahrscheinlich der nichtlineare Brechungsindex für das Fasermaterial des Zwei-Glas-Faserbündels kleiner als der für das des Drei-Glas-Faserbündels ist. Da mit dem Drei-Glas-Faserbündel eine stabilere und zuverlässigere Einzeladressierung der Fasern möglich war und die nichtlinearen Effekte vergleichbar sind, wurde für die weiteren Untersuchungen das Drei-Glas-Faserbündel verwendet.

3.3.4 Pulspropagation negativ gechirpter Pulse durch Lichtwellenleiter

Zur Erhaltung der Pulsdauer am Faserausgang wurde in dieser Arbeit eine Methode verwendet, mit der vor allem die Dispersion zweiter Ordnung reduziert werden kann. Die Bewertung der verschiedenen Möglichkeiten zur Pulskompression ergab die Verwendung eines Gitterpaars, da damit am flexibelsten die Dispersion zweiter Ordnung verändert werden kann (siehe Material und Methoden 2.8). Der Pulskompressor vor dem Fasereingang erzeugt einen negativen Chirp der spektralen Phase.

3.3.4.1 Charakterisierung des Pulskompressors

Zunächst soll die Funktionsweise des Gitterkompressors ohne weitere Komponenten getestet werden. Die Effizienz des Gitterkompressors wurde bei einer Eingangsleistung des Ti:Sa-Lasers von 295 mW gemessen. Nach dem ersten Gitter konnte eine maximale Leistung von 241 mW gemessen werden, das entspricht einer Effizienz von 82%. Am Ausgang des Gitterkompressors konnte eine Leistung von 133 mW gemessen werden. Die Gesamteffizienz ist somit 45%. Abbildung 3.14 zeigt die Pulsdauer am Ausgang des Gitterkompressors für zwei verschiedene Gitterabstände. Bei einem Abstand von 48 mm ergab sich eine Pulsdauer von 690 fs und bei einem Abstand von 14 mm eine Pulsdauer von 230 fs. Die Eingangspulsdauer betrug 120 fs bei einer spektralen Breite von 9 nm.

3.3.4.2 Pulspropagation negativ gechirpter Pulse durch Lichtwellenleiter

Im Folgenden soll die Pulspropagation von negativ gechirpten Pulsen durch die Fasern und die Auswirkung auf die Pulsdauer am Faserausgang untersucht werden. Um den Prechirp der Pulse zu variieren, wurde der Abstand zwischen den Gittern verändert. Im Anschluss wurde die Pulsdauer und die spektrale Breite am Faserausgang gemessen. Die Messungen wurden bei zwei verschiedenen Zentralwellenlängen $\lambda_0 = 800$ nm und $\lambda_0 = 825$ nm durchgeführt. In Abbildung 3.15 sind die Autokorrelation und das Spektrum

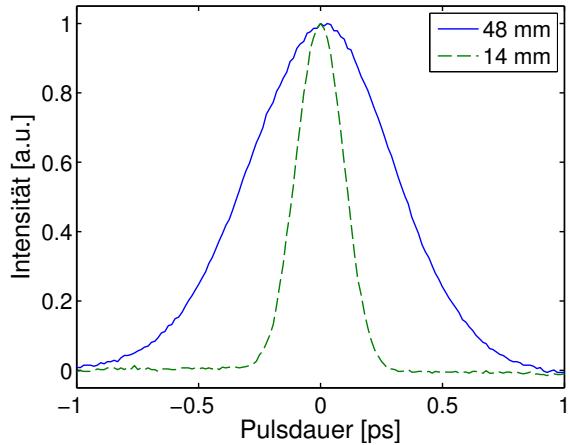


Abbildung 3.14 Vergleich der Autokorrelation direkt am Ausgang des Gitterkompressors für zwei verschiedene Gitterabstände 48 mm und 14 mm. Die Eingangspulsdauer betrug 120 fs und die spektrale Breite 9 nm.

für die verschiedenen Gitterabstände zum einen für die Monomodfaser (a)-(b) und zum anderen für eine einzeln adressierte Faser eines Drei-Glas-Faserbündels (c)-(d) bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 825$ nm gezeigt. Die Kurve der Autokorrelation zeigt einen Peak und zwei kleinere Nebenmaxima in den Flanken. Bei einer Änderung des Abstandes zwischen den Gittern ändert sich die Höhe der Nebenmaxima in der Autokorrelationskurve. Wegen des Auftretens dieser Nebenmaxima handelt es sich bei den vorliegenden Autokorrelationen nicht mehr um eine reine Gaußkurve. Die Angabe einer exakten Pulsdauer ist für diese Autokorrelationskurven ist damit nicht mehr exakt möglich. Als Maß für die Pulsdauer wurden die Kurven dennoch mit einer Gaußkurve gefittet. Dabei wurde darauf geachtet, dass der untere Flankenverlauf in der Anpassung gut erreicht wird. Damit wird die kürzeste Pulsdauer im Fall der Monomodfaser bei einem Gitterabstand von 37 mm und im Fall einer Faser des Drei-Glas-Faserbündels bei einem Abstand von 48 mm erreicht. Bei einem Abstand von 37 mm ist die angepasste FWHM der Pulsdauer am Ausgang der Monomodefaser (85 ± 5) fs bei einer spektralen Breite von $(6,7 \pm 1,0)$ nm und einer Ausgangsleistung von 17 mW. Die kürzeste Pulsdauer ist für eine Faser des Drei-Glas-Faserbündels (90 ± 10) fs bei einer spektralen Breite von (9 ± 1) nm und einer Ausgangsleistung von 20 mW. Die Eingangspulsdauer von (100 ± 5) fs kann mit Hilfe des Gitterkompressors nahezu wiederhergestellt werden. Die seitlichen Flanken in der Autokorrelation sind jedoch ein Hinweis darauf, dass die ursprüngliche Pulsförm nicht erreicht werden kann. Bei der Betrachtung des Spektrums fällt auf, dass mit zunehmendem Abstand der Gitter auch die spektrale Breite abnimmt und sogar kürzer als die Eingangsbreite von 10 nm wird. Abbildung 3.16 zeigt die gefittete Pulsdauer als Funktion des Gitterabstandes für die verschiedenen Fasern bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 800$ nm und $\lambda_0 = 825$ nm. Im Fall des Drei-Glas-Faserbündel wurden bei der Messung bei $\lambda_0 = 800$ nm am Faserausgang noch zwei Mikroskopobjektive hinzugefügt, da bei diesen Lasereinstellungen eine stabile Modenkopplung möglich war und somit gleichzeitig die Fluoreszenzintensität (siehe Abschnitt 3.3.4.3) gemessen werden konnte. Damit war es aufgrund der längeren Glasstrecke notwendig den Abstand der Gitter größer zu wählen. Ein Vergleich der Messungen zeigt, dass bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 825$ nm die angepassten

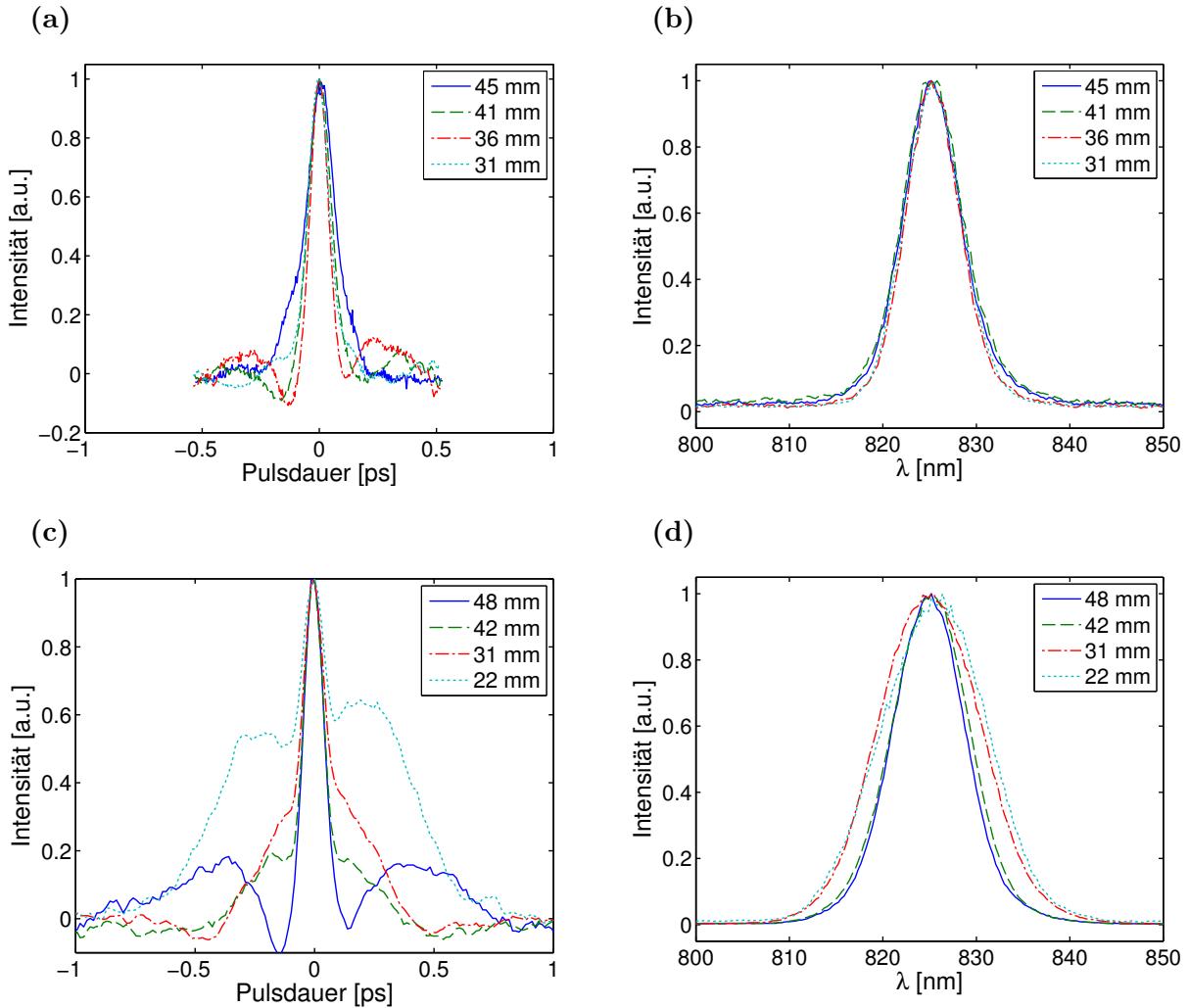


Abbildung 3.15 Autokorrelation und Spektrum negativ gechirpter fs-Pulse am Ausgang einer (a)-(b) Monomodefaser und (c)-(d) einer einzeln adressierten Faser eines Drei-Glas-Faserbündels; (a) und (c) zeigen die Autokorrelation (b) und (d) das Spektrum. Die Leistung am Ausgang der Monomodefaser betrug 17 mW und am Ausgang des Drei-Glas-Faserbündels 5 mW.

Pulsdauern kürzere Werte liefern als bei $\lambda_0 = 800$ nm. Dies trifft vor allem für die Messung an der Monomodfaser zu. Bei $\lambda_0 = 825$ nm ist die Pulsdauer (85 ± 5) fs im Vergleich zu einer Pulsdauer von (230 ± 10) fs bei $\lambda_0 = 800$ nm. Die dazugehörige spektrale Breite ist $(6,7 \pm 1,0)$ nm ($\lambda_0 = 825$ nm) und $(5,3 \pm 1,0)$ nm ($\lambda_0 = 800$ nm). Eine Übersicht der Messwerte ist in Tabelle 3.6 zu sehen. Im Anhang (Abbildung A.4) sind für jeweils die kürzeste Pulsdauer die dazugehörigen Fits gezeigt.

3.3.4.3 Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Anregung in Abhängigkeit des Prechirps

Die Anregungswahrscheinlichkeit der Zwei-Photonen-Fluoreszenz ist indirekt proportional zur Pulsdauer. Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass durch die Veränderung des Prechirps am Fasereingang die Pulsdauer am Faserausgang verändert werden kann.

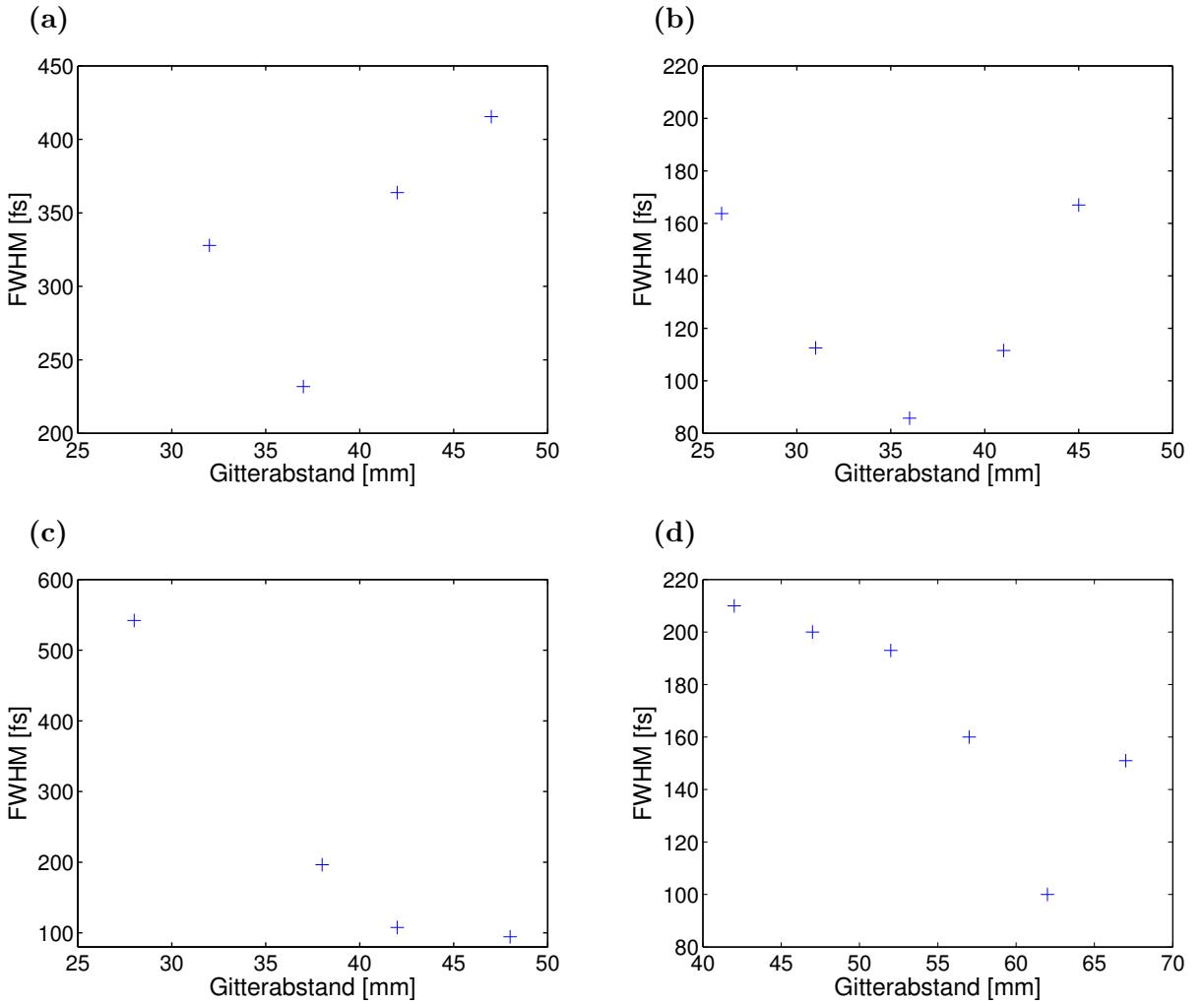


Abbildung 3.16 FWHM in Abhängigkeit vom Gitterabstand: (a)-(b) zeigt die Relation für die Monomodefaser (c)-(d) für das Drei-Glas-Faserbündel (a) und (c) bei einer Wellenlänge von 800 nm, (b) und (d) bei einer Wellenlänge von 825 nm. Die Leistung am Faserausgang betrug (a) 20 mW, (b) 17 mW und (c)-(d) 5 mW.

Da bei den Messungen die Pulsdauer nur indirekt über die Autokorrelation bestimmt wird, soll noch gezeigt werden, dass einer so bestimmten kürzeren Pulsdauer auch ein größeres Fluoreszenzsignal zugeordnet werden kann. Dafür wurden die Pulse aus dem Faserbündel mit einem Mikroskopobjektiv (NA 0,25) kollimiert und mit einem zweiten Mikroskopobjektiv (NA 0,75) auf eine Küvette mit einer fluoreszierenden Flüssigkeit fokussiert. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluorescein in einer 1,25 M wasserbasierten Lösung verwendet. Durch die Verwendung einer Küvette wurde ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs verhindert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte nicht über das Faserbündel, sondern im kollimierten Strahlengang zwischen den beiden Mikroskopobjektiven. Das Fluoreszenzlicht wurde dort mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels von der Anregung getrennt und mit einer Linse auf den Photomultiplier fokussiert (siehe Material und Methoden 2.1). Das Anregungslicht wurde zum einen mit Hilfe einer einzeln adressierten Faser und zum anderen mit mehreren einzeln adressierten

Fasern des Drei-Glas-Faserbündels appliziert. Um mehrere Fasern während einer Messung adressieren zu können, wurden die einzelnen Fasern abgescannt. Durch die Mittelung der Fluoreszenzsignale aus den einzelnen Fasern können Messfehler auf Grund von Schwankungen bei der Einkopplung in eine einzelne Faser vermieden werden. In Abbildung

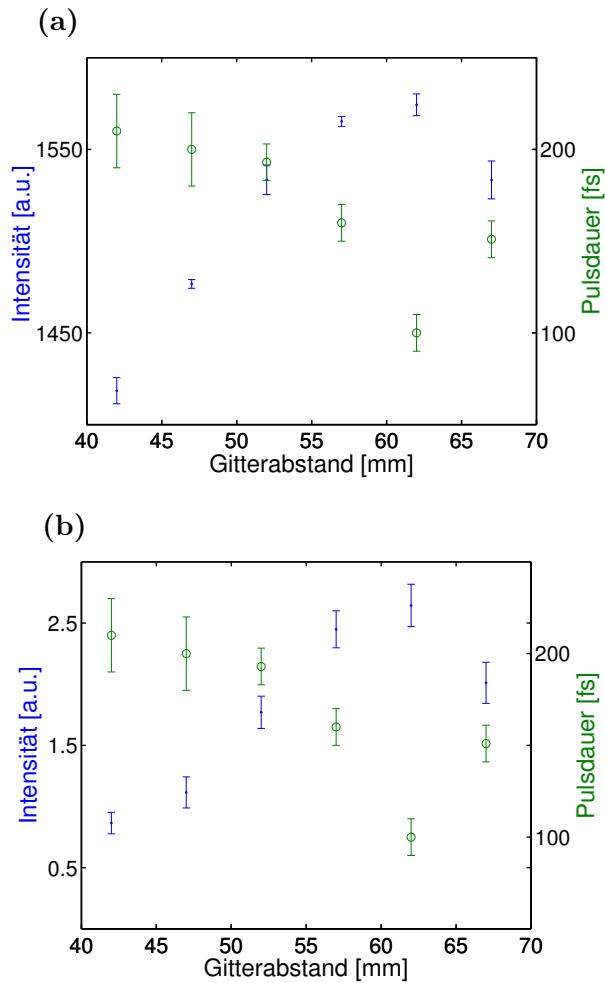


Abbildung 3.17 Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung durch ein Faserbündel in Abhängigkeit des Gitterabstandes. Linke y-Achse (blau) ist die Fluoreszenzintensität durch (a) eine einzelne Faser (b) durch das gesamte Faserbündel. Rechte y-Achse (grün) ist die Abhängigkeit der Pulsdauer vom Gitterabstand.

3.17 ist zu der Fluoreszenzintensität noch die gemessene Pulsdauer gezeigt. Die kürzeste Pulsdauer wurde bei einem Gitterabstand von 62 mm gemessen. Für diesen Abstand wurde auch die größte Fluoreszenzintensität gemessen. Die Messung über eine einzeln adressierte Faser und über mehrere einzeln adressierte Fasern liefert im Rahmen der Fehler (siehe Abbildung 3.17) gleiche Ergebnisse.

3.3.4.4 Diskussion

Die Charakterisierung des Gitterkompressors zeigt, dass die Länge der Pulse am Fasereingang von einer Pulsdauer von 690 fs bis 230 fs variabel einstellbar ist. Daraus

lässt sich mit Hilfe der Formel aus Gleichung 1.37 eine GDD von ca. -8000–26 000 fs² abschätzen. Dabei wurde mit Fourier-limitierten Gaußpulsen ($\Delta\lambda = 9\text{ nm}$) gerechnet. Dieser Einstellbereich reicht damit theoretisch zur Kompensation der GDD für eine Glasstrecke von etwa 25–70 cm Glas (SQ1, $d^2n/d\lambda_0^2 = 0,039\,88/\mu\text{m}^2$ bei 800 nm, siehe Gleichung 1.34). Die Justage des Gitterkompressors ermöglicht eine stabile Ausgangslage des Laserstrahls auch bei einer linearen Verstellung der Gitterposition. Allerdings können kaum sichtbare Bewegungen der Lage des Laserstrahls schon Probleme bei der Einkopplung in eine einzelne Faser hervorrufen. Die Wellenfrontverzerrung des Laserprofils durch den Gitterkompressor und den Autokorrelator sind ein weiteres Problem bei der Fokussierung des Laserstrahls auf das Faserbündel. Durch diese Verzerrung ist mit einer Vergrößerung des fokussierten Laserstrahldurchmessers zu rechnen. Diese Probleme wurden soweit minimiert, dass eine stabile Einkopplung in einzeln adressierte Fasern des Drei-Glas-Faserbündels möglich war,. Bei Verwendung des Zwei-Glas-Faserbündels war die Einkopplung allerdings nicht stabil genug, um diese Messungen zu wiederholen .Die Verluste in der mittleren Leistung durch den Gitterkompressor sind höher als erwartet. Der Verlust von 17% der mittleren Leistung nach einem Gitter ist höher als der vom Hersteller angegebene Wert von ca. 8%. Laut Hersteller ist mit größeren Verlusten zu rechnen, wenn eine Konfiguration abweichend von der Littrow-Konfiguration oder eine andere Polarisation gewählt wurde. Bei 800 nm ist nur ein Einfallswinkel nahe der Littrow-Konfiguration möglich, da der Glanzwinkel des Gitters bei einer Wellenlänge von 800 nm liegt. Möglicherweise könnte mittels eines $\lambda/2$ -Plättchens die Polarisation leicht gedreht werden und so die Effizienz weiter verbessert werden. Problematisch ist die Potenzierung der Verluste durch die vierfachen Reflexionen des Strahls an den Gitter. Eine höhere Effizienz wäre für Gitter mit einer Gitterkonstante nahe des Kehrwerts der verwendeten Wellenlänge möglich. Bei 800 nm ergibt sich damit eine optimale Gitterkonstante von 1200 L/mm. Allerdings ist damit aufgrund der höheren Dispersion der benötigte Abstand zwischen den Gittern geringer und die Gitter schwerer zu justieren. Aufgrund der limitierten Ausgangsleistung des Ti:Sa-Laser von 450 mW steht durch die Gesamteffizienz des Gitterkompressors von 45% und des Autokorrelators von ebenfalls 45% ohne die Verluste von Optiken und Spiegeln eine mittlere Leistung von <90 mW zur Einkopplung in die Fasern zur Verfügung. Da die erwartete Effizienz von ca. 70% nicht erreicht wurde, ist eine alternative Lösung mit gechirpten Spiegeln oder Prismen doch eine effizientere und leichter handhabbare Möglichkeit.

Die Messungen zur Charakterisierung der Propagation der durch den Gitterkompressor negativ gechirpten Pulse zeigen, dass die Eingangspulsdauer für eine Faser des Drei-Glas-Faserbündels näherungsweise wiederhergestellt werden konnte. Allerdings deuten die Peaks in den seitlichen Flanken in der Autokorrelation auf einen Nebenpuls hin. Die Eingangspulsform kann nicht wiederhergestellt werden.

Bei einem optimalen Gitterabstand wird die kürzeste Pulsdauer erwartet. Die Angabe der Pulsdauer erfolgte über eine Anpassung der Autokorrelation mit einer Gaußkurve und der daraus resultierenden FWHM. Vor allem bei der kürzesten Pulsdauer werden durch den Fit die Pulsflanken nicht berücksichtigt. Die Angabe der FWHM ist daher kritisch zu betrachten, da diese eine Verschlechterung der Pulsqualität (Nebenmaxima) somit nicht widerspiegelt. Dennoch kann mit dieser Methode am besten die Veränderung der Pulsdauer mit variablem Gitterabstand aufgezeigt werden. Durch die Messung des

Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit des Gitterabstands konnte gezeigt werden, dass der am Faserende kürzesten Pulsdauer auch das größte Fluoreszenzsignal zugeordnet werden kann. Das Fluoreszenzsignal ist theoretisch indirekt proportional zur Pulsdauer. Da hier nur die Autokorrelation gemessen wurde und die Pulsform von einer Gaußkurve abweicht, ist eine indirekte Proportionalität nicht unbedingt zu erwarten. Die Änderung der Pulsform wird wahrscheinlich durch die nichtlineare Dispersion in der Faser hervorgerufen. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3 haben bereits gezeigt, dass nichtlineare Effekte bei der Pulspropagation von ungechirpten Pulsen durch die verwendeten Lichtwellenleiter auftreten. Weiterhin spricht die Verengung der spektralen Breite der Pulse („spectral narrowing“) für das Auftreten von nichtlinearen Effekten. Dieser Effekt wurde theoretisch von Planas u. a. [1993] und experimentell von Washburn, Buck und Ralph [2000] beschrieben. Durch den negativen Chirp der spektralen Phase der Pulse befinden sich die kurzwelligeren spektralen Komponenten des Pulses an der Pulsfront und die langwelligeren spektralen Komponenten am Pulsrücken. Die Selbstphasenmodulation bewirkt nun, dass die kurzwelligen spektralen Komponenten zu längeren Wellenlängen und die langwelligeren spektralen Komponenten zu kürzeren Wellenlängen verschoben werden (siehe Abbildung 1.9). Das Spektrum wird komprimiert und somit schmäler. Da am Faserausgang dennoch nahezu Fourier-limitierte Pulse entstehen können [Washburn, Buck und Ralph, 2000], bewirkt die spektrale Kompression der Pulse, dass die Pulse am Faserausgang länger sind als die Eingangspulse. Theoretisch und praktisch ist es damit nicht möglich, gleichzeitig die zeitlichen und spektralen Eigenschaften der Pulse am Faserausgang vollständig wiederherzustellen. Um am Faserausgang dennoch kurze Pulse zu erzeugen, wurde von Clark, Ilday und Wise [2001] vorgeschlagen die Pulse nicht nur zeitlich sondern auch spektral zu formen, indem vor dem Gitterkompressor das Spektrum mit einer zusätzlichen Faser verbreitert wird. Dieser Ansatz wurde für die Zwei-Photonen-Endomikroskopie von Lelek u. a. [2007] weiterentwickelt. Problematisch ist dabei, dass durch eine weitere Faser hohe Leistungsverluste vor allem durch die Leistungsbegrenzung innerhalb der Faser entstehen und dieser Ansatz damit nur dann praktikabel ist, wenn die damit verbundenen Verluste toleriert werden können und die Korrektur notwendig ist. Die Effekte der Selbstphasenmodulation werden dadurch nicht verhindert, sondern nur durch eine weitere Faser das Eingangsspektrum verbreitert. Theoretische wären somit sehr viel kürzere Pulse möglich, die dann durch die zweite Faser wieder verlängert werden. Da die Eingangspulse durch den Gitterkompressor einen negativen Chirp in der spektralen Phase besitzen und die Selbstphasenmodulation einen Chirp in der zeitlichen Phase erzeugt, gibt es für die auftretenden Wechselwirkungen keine analytische Möglichkeit die Effekte zu beschreiben, aber mittels numerischer Simulationen (z.B. mit $\mathcal{LAB}^{\text{II}}$) können die Effekte studiert werden.

3.3.5 Simulationen

Simulationen bieten eine sehr gute Möglichkeit, die bisherigen Ergebnisse genauer zu analysieren und einige Effekte besser zu verstehen. Mit Hilfe des Simulationstools $\mathcal{LAB}^{\text{II}}$ [Schmidt u. a., 2011] wurden die verschiedenen Elemente kombiniert und so die jeweiligen Konfigurationen simuliert (siehe Material und Methoden 2.10). Die Simulationsergebnisse aus der Diplomarbeit von Andreas Delker wurden nicht übernommen, da neue Erkenntnisse und weitere Herstellerangaben verfügbar waren. Zur Verifizierung der $\mathcal{LAB}^{\text{II}}$ -Simulation ist

es notwendig, sowohl die lineare als auch die nichtlineare Dispersion zu untersuchen. Für die Untersuchung der linearen Dispersion wurde daher das „Transparent dispersive element.vi“ und für die nichtlineare Dispersion das „Transparent nonlinear medium.vi“ gewählt. Der Eingangspuls wurde mit „Generate Gauss.vi“ erzeugt. Bei nicht Fourier-limitierten Eingangspulsen in der Messung wurde die Pulsdauer mit Hilfe „Ideal shaper.vi“ angepasst, indem ein positiver zweiter Ordnungsterm in der spektralen Phase hinzugefügt wurde.

3.3.5.1 Lineare Dispersion

Zur Verifizierung der linearen Dispersion wurden als Vergleichsmessung die Pulsdauer nach zwei Glasstäben (Wagner & Munz GmbH, München) mit verschiedener Länge (10 und 20 cm) gemessen und mit der Simulation verglichen (siehe Tabelle 3.3). Der Ausgangsdurchmesser des Laserstrahls wurde hierbei nicht verändert und entspricht an der Messposition ca. 1,8 mm. Damit sind Nichtlinearitäten zu vernachlässigen. Ein Vergleich mit der Simulation zeigt, dass die gemessene Pulsdauer kürzer als die simulierte Pulsdauer ist. Aus den Ergebnissen der beiden Glasstablängen ist zu erkennen (siehe Tabelle 3.3), dass die Dispersion des kürzeren Glasstabs in der Simulation kleiner und des längeren Glasstabs in der Simulation größer ist als in der Messung. Bei der Simulation wurde die spektrale Breite der Pulse gleich gewählt. Die Pulsdauer wurde bei der Simulation nicht an die gemessene Pulsdauer angepasst, da hier nur wenig zusätzliches Glas oder andere Verzögerungen im Aufbau vorhanden waren.

Glasstab		τ_p		$\Delta\lambda$	
		Messung	Simulation	Messung	Simulation
Eingang		130 fs	110 fs		
Ausgang	10 cm	230 fs	210 fs	8,5 nm	
	20 cm	340 fs	380 fs		

Tabelle 3.3 Vergleich der gemessenen und simulierten Pulsdauer nach den Glasstäben. Das gewählte Material ist ArGlass.

3.3.5.2 Nichtlineare Dispersion

Da die Effekte durch die Selbstphasenmodulation hauptsächlich in den ersten Zentimetern der Ausbreitung auftreten [Clark, Ilday und Wise, 2001], wurde zur Untersuchung nach Möglichkeit eine kurze Faserstrecke gewählt, um den Effekt der linearen Dispersion zu minimieren. In Tabelle 3.4 ist der Vergleich der Simulation mit der Messung bei Verwendung einer 11 cm langen Monomodefaser gezeigt. Die Simulation zeigt eine größere spektrale Verbreiterung als die Messung und damit auch eine längere Pulsdauer. Die Einkoppeloptik und die Spiegel im Aufbau wurden durch das Einfügen von 5 cm Glasstrecke berücksichtigt. Tabelle 3.5 zeigt den Vergleich der Simulation mit der Messung eines 5 cm langen Zwei-Glas-Faserbündels. Wie bei der vorherigen Messung ist die simulierte spektrale Breite größer als die gemessene spektrale Breite (siehe auch

Messung und Simulation: Monomodefaser					
	τ_p	Messung	Simulation	$\Delta\lambda$	
				Messung	Simulation
Eingang		115 fs	115 fs	9 nm	9 nm
Ausgang	10 mW	220 fs	250 fs	12 nm	12 nm
	40 mW	300 fs	380 fs	13 nm	24 nm

Tabelle 3.4 Verifizierung der Simulationen bei Verwendung einer 11 cm langen Monomodefaser. $1800 \text{ fs}^2 = 5 \text{ cm}$; Modenfelddurchmesser $5,1 \mu\text{m}$; Material SQ1 mit $n_2 = 2,6 \times 10^{-16} \text{ cm/W}^2$

Zwei-Glas-Faserbündel					
	τ_p	Messung	Simulation	$\Delta\lambda$	
				Messung	Simulation
Eingang		110 fs	110 fs	9 nm	9 nm
Ausgang	20 mW	-	210 fs	14 nm	18 nm
	40 mW	310 fs	280 fs	15 nm	31 nm
	65 mW	-	320 fs	29 nm	39 nm

Tabelle 3.5 Verifizierung der Simulationen bei Verwendung einer Einzelfaser eines 5 cm langen Zwei-Glas-Faserbündels. $1200 \text{ fs}^2 = 5 \text{ cm}$; Modenfelddurchmesser $3,5 \mu\text{m}$; Material SQ1 mit $n_2 = 2,6 \times 10^{-16} \text{ cm/W}^2$

Abbildung 3.13). Die gemessene Pulsdauer ist allerdings etwas breiter als die simulierte Pulsdauer. Ähnliche Ergebnisse zeigt Tabelle 3.6 für das Drei-Glas-Faserbündel. Die

Drei-Glas-Faserbündel $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$					$\lambda_0 = 825 \text{ nm}$				
	τ_p	Mes.	Sim.	$\Delta\lambda$		τ_p	Mes.	Sim.	$\Delta\lambda$
Ein.		110 fs	110 fs	9 nm	9 nm		100 fs	100 fs	10 nm
Aus.	8 mW	-	1,9 ps	23 nm	23 nm	8 mW	1,9 ps	1,9 ps	22 nm
	20 mW	2,7 ps	4,2 ps	27 nm	42 nm	15 mW	2,4 ps	3,2 ps	25 nm
	40 mW	-	7 ps	31 nm	83 nm	21 mW	2,7 ps	4,4 ps	27 nm

Tabelle 3.6 Verifizierung der Simulationen einer Einzelfaser eines 64 cm langen Drei-Glas-Faserbündels. Modenfelddurchmesser $3,5 \mu\text{m}$; Material BK7 mit $n_2 = 4,3 \times 10^{-16} \text{ cm/W}^2$

Messungen wurden bei einer Faserlänge von 64 cm durchgeführt, da die Länge des Drei-Glas-Faserbündels nicht verändert werden kann. Die Messungen und die Simulationen wurden für zwei Zentralwellenlängen $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ und $\lambda_0 = 825 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Ergebnisse bei 8 mW zeigen, dass hier die simulierte spektrale Breite mit der Messung im Rahmen der Fehler übereinstimmt. Das gilt auch für die Pulsdauer. Bei zunehmender

Leistung gibt es allerdings auch zunehmende Abweichungen. Insgesamt wird bei dieser Simulation die lineare Dispersion als etwas zu gering simuliert, dafür wird allerdings die nichtlineare Dispersion als etwas zu hoch simuliert.

3.3.5.3 Gitterkompressor

Für die Simulationen in diesem Abschnitt wurde in das Programm vor dem Fasereingang ein Gitterkompressor mit „Grating Compressor.vi“ eingefügt. Im Anhang sind die in Tabelle A.2 verwendeten Simulationsparameter für den Gitterkompressor zu finden. In

Gitterkompressor		τ_p		$\Delta\lambda$	
		Messung	Simulation	Messung	Simulation
Eingang	Abstand	120 fs	120 fs		
Ausgang	14 mm	230 fs	224 fs	9 nm	
	28 mm	430 fs	470 fs		
	48 mm	690 fs	830 fs		

Tabelle 3.7 Vergleich der Simulation des Gitterkompressors mit der Messung; 2200 fs^2 , $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$

Tabelle 3.7 ist der Vergleich der Simulation des Gitterkompressors mit der Messung (siehe Abbildung 3.14) zu sehen. Mit zunehmendem Gitterabstand wird auch die Abweichung der Simulation von der Messung größer. Die Simulation liefert bei einem Abstand von 48 mm eine 1,2-fach längere Pulsdauer als die Messung.

3.3.5.4 Simulation der Pulspropagation negativ gechirpter Pulse durch Lichtwellenleiter

Für die Simulation der Propagation von negativ gechirpten Pulsen durch die Glasfaser wurde nach dem Gitterkompressor ein nichtlineares transparentes Medium eingefügt. Dabei wurde für einen variierenden Gitterabstand die zeitliche und spektrale FWHM der Pulse am Faserende bestimmt. In die Simulation wurde noch vor das nichtlineare Element ein 20 cm langes lineares transparentes Medium (Material SQ1) eingefügt, um die zusätzlichen Glasstrecken (Einkoppelobjektiv, Spiegel und Linsen) zu berücksichtigen. Das Element addiert auf den Puls somit eine GDD von 7200 fs^2 . Als Eingangspulse wurden Fourier-limitierte Pulse verwendet. Die Simulationsparameter für die Fasern sind in Tabelle A.1 zusammengestellt. Simuliert wurde am Faserausgang die zeitliche sowie die spektrale Intensität der Pulse und die dazugehörigen FWHMs (angegeben mit Hilfe eines Gaußfits). In Abbildung 3.18 ist die simulierte FWHM der Pulsdauer in Abhängigkeit des Gitterabstandes für (a) die Monomodefaser und (b) eine Einzelfaser des Drei-Glas-Faserbündels für zwei verschiedene Zentralwellenlängen zu sehen. Bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ ergibt sich für die Monomodefaser die kürzeste Pulsdauer bei einem Gitterabstand von 41 mm. Die Pulsdauer beträgt dort 270 fs mit einer spektralen Breite von 5,2 nm. Für eine Wellenlänge von 825 nm verschiebt sich das

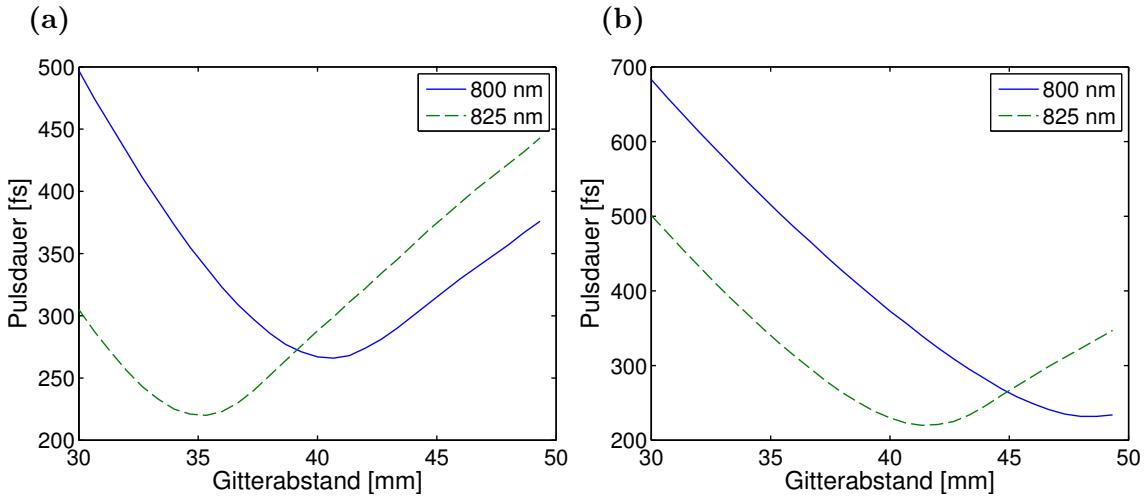


Abbildung 3.18 Simulation der Pulsdauer als Funktion des Gitterabstandes: (a) Monomodefaser (b) Einzelfaser eines Drei-Glas-Faserbündels bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ und $\lambda_0 = 825 \text{ nm}$. Simulationsparameter der Gitter siehe Tabelle A.2; Simulationsparameter der Fasern siehe Tabelle A.1

Minimum der Pulsdauer zu einem Gitterabstand von 35 mm und ist dort 220 fs bei einer spektralen Breite von 8,7 nm (siehe Abbildung 3.18 (a)). Im Fall einer Einzelfaser des Drei-Glas-Faserbündels ist die simulierte kürzeste Pulsdauer bei einem Gitterabstand von 48 mm ($\lambda_0 = 800 \text{ nm}$). Die Pulsdauer ist 230 fs bei einer spektralen Breite von 4,7 nm. Für $\lambda_0 = 825 \text{ nm}$ verschiebt sich wiederum das Minimum der Pulsdauer zu einem Gitterabstand von 41 mm. Die Pulsdauer beträgt damit 220 fs bei einer spektralen Breite von 7,8 nm. Ein Vergleich mit der Messung (siehe Abbildung 3.16) zeigt zum einen dass die gefütteten Pulsdauern am Faserausgang wesentlich kürzer sind als die simulierten Pulsdauern. Zum anderen ist der optimale Gitterabstand in der Messung nicht von der Zentralwellenlänge abhängig (Monomodefaser). Ähnlich wie in der Simulation ist jedoch der Gitterabstand im Fall der Monomodefaser kürzer als für das Drei-Glas-Faserbündel. Die Simulationsparameter wurden möglichst passend zu den Experimenten gewählt. Um den Einfluss der einzelnen Parameter (Kerndurchmesser, mittlere Leistung, nichtlinearer Brechungsindex, spektrale Breite) zu untersuchen, wurde in Abbildung 3.19 jeweils nur ein Parameter isoliert variiert: (a) der Kerndurchmesser, (b) die mittlere Leistung, (c) der nichtlineare Brechungsindex n_2 und (d) die spektrale Breite der Eingangspulse. Als Faser wurde hierfür das Drei-Glas-Faserbündel gewählt. Die Variation der Parameter ist dabei im Bereich der Unsicherheiten, z.B. durch Fehler in der Messung oder unbekannte Materialeigenschaften. Aus diesen Simulationen lässt sich ablesen, dass bei größeren Nichtlinearitäten (größere mittlere Leistung, kleinerer Kerndurchmesser, größerer nichtlinearer Brechungsindex) zum einen die Pulsdauer am Faserausgang zunimmt und zum anderen der Gitterabstand geringer wird. Zum Vergleich wurde zusätzlich in der Simulation das nichtlineare Element durch ein lineares Element ersetzt. Damit ergibt sich ein größerer Gitterabstand als im nichtlinearen Fall. Bei den Experimenten zur Zwei-Photonen-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Gitterabstandes wurden nach der Faser noch zwei Mikroskopobjektive verwendet. In den Simulationen wurde angelehnt an diese

Situation als eine weitere Möglichkeit das zusätzliche lineare Element nicht vor das nichtlineare Element sondern am Faserende eingesetzt. Ein Vergleich zeigt, dass durch den veränderten Aufbau, wie zu erwarten, weniger nichtlineare Effekte entstehen. Der Grund dafür ist, dass pregechirpte Pulse eine niedrigere Pulsintensität besitzen und damit weniger nichtlineare Effekte hervorgerufen werden. Wenn am letzten Element nur ein nichtlineares Element betrachtet wird, steigt jedoch die Pulsintensität durch den geringer werdenden Prechirp an und nichtlineare Effekte treten auf. Wenn als letztes Element aber ein lineares Element verwendet wird, ist die Pulsintensität in dem linearen Element am höchsten und es treten weniger nichtlineare Effekte auf.

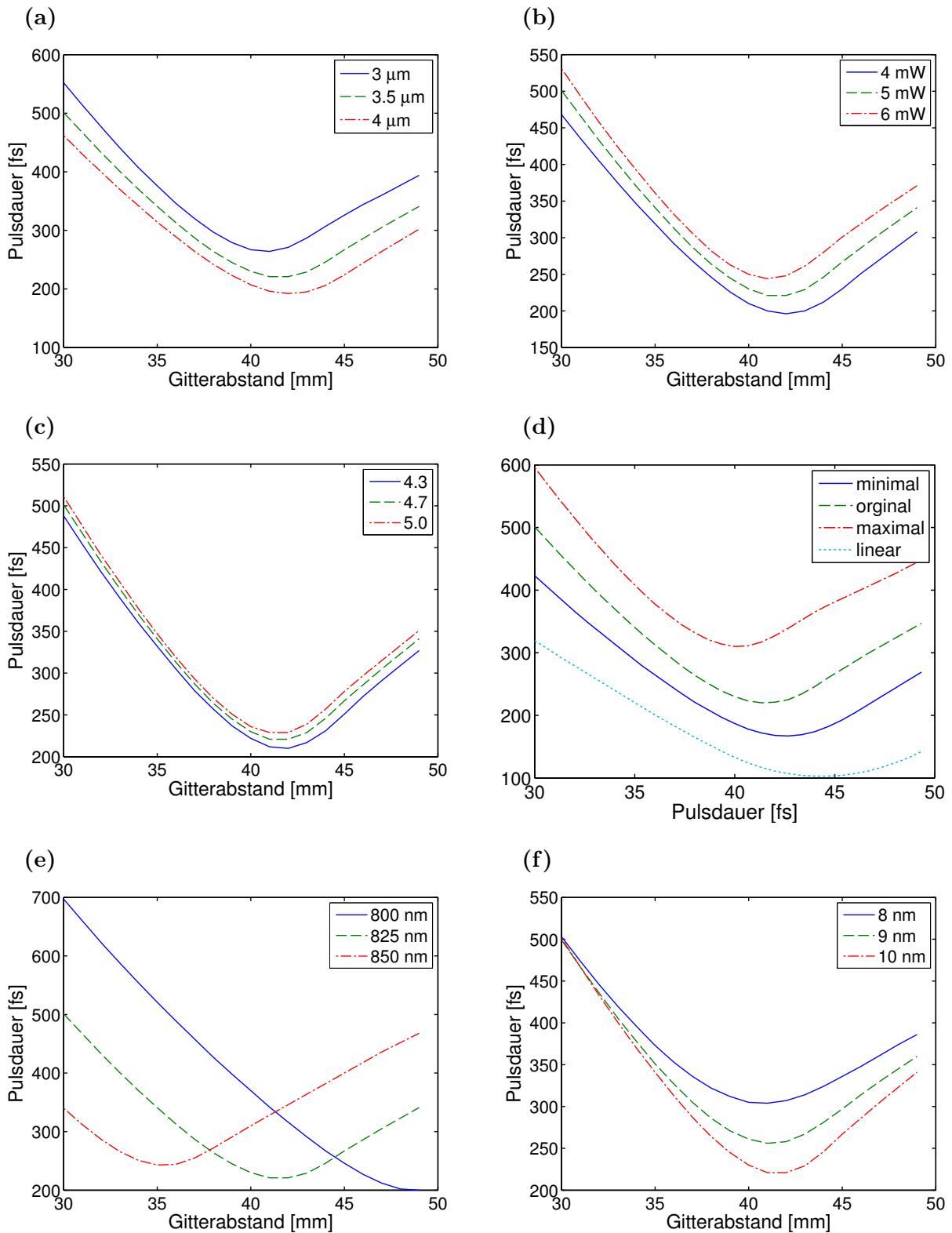


Abbildung 3.19 Variation der Simulationsparameter: (a) Variation des Kerndurchmessers (b) der mittleren Leistung (c) des nichtlinearen Brechungsindex (d) der spektralen Breite der Eingangspulse

3.3.5.5 Diskussion

Die Verifizierung des Simulationsprogramms $\mathcal{L}\mathcal{A}\mathcal{B}^{\text{II}}$ ergibt, dass bei einem Vergleich der Messwerte mit der Simulation teilweise Abweichungen vorhanden sind. Es zeigen sich bereits kleine Abweichungen der Simulationen von den Messungen bei Betrachtung der Pulsdauer nach den beiden Glasstäben. Bei dieser Simulation ist das Material bekannt und es müssen nur lineare Effekte betrachtet werden. Damit sind die Anzahl und die Unsicherheit der Eingangsparameter beschränkt und somit ist auch der Einfluss möglicher Messunsicherheiten verglichen mit späteren Simulationen gering. Die spektrale Breite der Pulse ist allerdings bereits ein wichtiger Eingangsparameter, der einen der größten Einflüsse auf das Messergebnis hat. Aufgrund der thermischen Schwankungen des Lasers und der Auflösung des Spektrometers kann die Messunsicherheit mit ca. $\pm 1 \text{ nm}$ angegeben werden. Je schmäler das Spektrum wird, desto größer wird allerdings auch die Messunsicherheit (ca. $\pm 2 \text{ nm}$). Dieser Effekt lässt sich mit der Annäherung an die Auflösungsgrenze des Spektrometers begründen. Bei einer Messunsicherheit von $\pm 1 \text{ nm}$ variiert die simulierte Ausgangspulsdauer um $\pm 37 \text{ fs}$ bei einer Glasstablänge von 20 cm. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass je schmäler die spektrale Breite der Eingangspulse ist, desto weniger lineare Dispersion erfährt der Puls. Mit einem schmäleren Eingangsspektrum vergrößert sich damit die Abweichung für den kurzen Glasstab, hingegen ist die Übereinstimmung für den langen Glasstab sehr gut. Eine mögliche Ursache für die Abweichung ist, dass bei der Messung keine Fourier-limitierten Pulse vorhanden waren. Die Pulsdauer ist länger als für eine spektrale Breite von 8,5 nm zu erwarten ist. Für eine Verlängerung der Pulsdauer kann die Dispersion zweiter oder dritter Ordnung (SOD oder TOD) bzw. eine Kombination verantwortlich sein. In der Simulation kann dies berücksichtigt werden. Bei einer Messung der Intensitätsautokorrelation zweiter Ordnung kann allerdings nicht zwischen SOD und TOD unterschieden werden. Daher wurde bei den Simulationen als Eingangspuls ein Fourier-limitierter Puls verwendet. In der Simulation wird die GVD aus der zweiten Ableitung des Brechungsindex $n(\lambda)$ berechnet und damit die Pulsdauer am Faserausgang simuliert. Höhere Ordnungen werden daher nicht berücksichtigt. Die Abweichungen können z.B. über einen unbekannten TOD Term bereits am Eingang des Glasstabs oder hervorgerufen durch den Glasstab erklärt werden.

Die Simulation des Pulskompressors im Vergleich mit den Messungen (siehe Tabelle 3.7) zeigt, dass bei einem geringen Gitterabstand die simulierte Pulsdauer kürzer als die gemessene Pulsdauer ist, jedoch bei einem großen Gitterabstand die simulierte Pulsdauer länger als die Messung ist. Die unterschiedlichen Messunsicherheiten, wie Pulsdauer, Breite des Pulsspektrum, der Einfallswinkels oder der Gitterabstands können Abweichungen der Simulationsergebnisse von den Messungen erklären. Die Messunsicherheit der spektralen Breite von ca. $\pm 1 \text{ nm}$ hat dabei die größte Auswirkung auf die Simulationsergebnisse. Je breiter das Spektrum ist, desto mehr anormale Dispersion (negativer Prechirp) wird erzeugt und umgekehrt. Damit variiert die Pulsdauer um $\pm 90 \text{ fs}$ bei einem Gitterabstand von 48 mm. Eine Messunsicherheit des Gitterabstandes von $\pm 2 \text{ mm}$ erzeugt eine Variation der Pulsdauer von $\pm 35 \text{ fs}$ bei einem Gitterabstand von 48 mm). Der Einfallswinkel hat einen vergleichsweise kleinen Einfluss auf das Ergebnis, je kleiner der Einfallswinkel ist, desto mehr anormale Dispersion wird erzeugt. Bei einer Messunsicherheit von $\pm 2^\circ$ variiert die Pulsdauer um $\pm 15 \text{ fs}$ (Gitterabstand 48 mm). Die Messunsicherheiten sind

alle unabhängig von einander, die Beeinflussung auf das Messergebnis allerdings nicht. Mit der größten Abweichung der Parameter (spektrale Breite 8 nm, Gitterabstand 46 mm, Einfallswinkel 16°) wird eine Pulsdauer von 690 fs am Ausgang der Gitter simuliert. Die Abweichung der Simulationsergebnisse kann mit Messunsicherheiten erklärt werden. Aber auch bei diesen Messungen ist zu beachten, dass die Bestimmung der Pulsdauer über die Intensitätsautokorrelation eine Ursache der Abweichungen sein könnte. Bei dem Durchgang der Pulse durch transparente Medien und bei der Erzeugung des Prechirps mit einem Gitterkompressor spielen neben der SOD auch höhere Ordnungen eine Rolle. Eine exaktere Methode wäre daher die Phase der Pulse zu messen.

Die Simulationen bei Verwendung der verschiedenen Fasern (siehe Tabelle 3.4, Tabelle 3.5, Tabelle 3.6) zeigen, dass die simulierte spektrale Breite mit zunehmender Leistung größer als die gemessene spektrale Breite ist. Damit werden letztendlich die nichtlinearen Effekte stärker simuliert als gemessen. Für die Simulation der Effekte der Fasern wurde ein nichtlineares dispersives Element gewählt. Damit wird in den Simulationen nur die Selbstphasenmodulation berücksichtigt. Andere nichtlineare Effekte, wie z.B. die Erzeugung von SHG in der Faser, können aber ebenfalls auftreten. Die Erzeugung von SHG und möglicherweise Drei-Photonen-Anregung von Fluoreszenz in der Faser konnte bei hohen Leistungen beobachtet werden. Einige nichtlineare Effekte (Selbstaufteilung oder vier Wellenmischung) sind zwar in manchen Simulationsmodellen eingebaut, dafür werden aber andere Effekte (SHG oder Drei-Photonen-Anregung) nicht berücksichtigt. Die Vorgänge in der Faser sind zu komplex, um alle Faktoren simulieren zu können. Hinzu kommt, dass zu den bereits diskutierten Messunsicherheiten noch weitere Unsicherheiten hinzukommen. Zum einen werden einige Angaben des Herstellers, wie die Zusammensetzung des Faserkernmaterials, nicht weitergegeben, zum anderen sind andere Angaben, wie z.B. der nichtlineare Brechungsindex oder der Modenfelddurchmesser der Fasern dem Hersteller nicht bekannt. Für eine realistischere Simulation müsste daher der nichtlineare Brechungsindex und der Modenfelddurchmesser gemessen werden.

Da sowohl bei der Simulation der GVD, der Selbstphasenmodulation und des Gitterkompressors Abweichungen festzustellen sind, ist auch mit Abweichungen bei der Simulation negativ gechirpter Pulse durch die Fasern zu rechnen. Die vorherigen Simulationsergebnisse zeigen stärkere lineare und nichtlineare Effekte, als diese gemessen werden. Bei einer Simulation mit Gitterkompressor und Faser beeinflussen sich die linearen Effekte und die nichtlinearen Effekte. Es ist daher theoretisch auch mit einer Aufhebung von Abweichungen zu rechnen. Trotz der Abweichungen eignen sich die Simulationen gut, um einige Effekte besser zu erklären. Die Simulation zeigt z.B., dass sich bei einer Verstärkung der nichtlinearen Effekte der Gitterabstand verkürzt. Dieser Effekt erscheint auf den ersten Blick überraschend, lässt sich aber mit der auch experimentell gemessenen spektralen Verengung („spectral narrowing“) der negativ gechirpten Pulse erklären (siehe Kapitel 3.3.4.4). Am Ende der Faser können theoretisch nahezu Fourier-limitierte Pulse erzeugt werden, die spektral enger sind als die Eingangspulse. Je mehr nichtlineare Effekte in der Faser entstehen sind desto schmäler werden die Pulse am Faserende. Je spektral schmäler die Pulse sind desto länger wird aber auch die mögliche optimale Pulsdauer. Da die optimale Pulsdauer länger geworden ist wird auch weniger negativer Chirp benötigt, um diese zu erzeugen und somit wird der optimale Gitterabstand geringer. Die Simulation

von nichtlinearen Effekten ist insgesamt komplex und aufwendig und einige Effekte werden hierbei vernachlässigt. Auch experimentell sind aufwendige Methoden notwendig und die Messungen sind sehr empfindlich und störanfällig. Neben den hier verwendeten Methoden, wie z.B. der Autokorrelation, können noch umfangreichere Methoden angewandt werden, wie z.B. FROG-Messungen. Sowohl die experimentelle Seite als auch die Simulation könnte daher verbessert werden.

3.4 Biologische Anwendung

3.4.1 Bilder

Um eine mögliche Anwendung eines Zwei-Photonen-Endomikroskopies zu testen, wurden im Folgenden Zwei-Photonen Bilder von verschiedenen Proben angefertigt. Zeitweise stand für die Experimente ein weiterer Femtosekundenlaser, *femto*TRAIN™ Yb (siehe Material und Methoden 2.2) mit einer Wellenlänge von 1040 nm zur Testung zur Verfügung. Dieser Laser besitzt einige entscheidende Vorteile gegenüber dem Ti:Sa-Laser. Der wichtigste Vorteil ist die Stabilität (Modenkopplung und thermische Stabilisierung) des Lasers und die höhere Ausgangsleistung (2,75 mW). Bei hoher Leistung spielt zudem die Autofluoreszenz des Faserbündels bzw. auch innerhalb einer Faser erzeugte SHG-Signale eine zunehmende Rolle. Mit einer Anregung von $\lambda_0 = 800$ nm ist das Autofluoreszenzsignal um eine Wellenlänge von 530 nm verteilt. Mit einer Anregung von $\lambda_0 = 1040$ nm ergibt sich ein Peak bei der zweiten Harmonischen 520 nm und um 410 nm. Durch die längere Anregungswellenlänge können Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum im grünen Spektralbereich angeregt werden. Die Emission liegt damit tendenziell im roten Spektralbereich. Mit einem Langpassfilter ab 530 nm kann damit das Fluoreszenzsignal von der Autofluoreszenz des Faserbündels getrennt werden. Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 800$ nm ist tendenziell das Fluoreszenzsignal ebenfalls im grünen Spektralbereich und kann somit nicht von der Autofluoreszenz des Faserbündels getrennt werden. Der verwendete Farbstoff (Kresylviolett) besitzt zudem eine höhere Einphotonen-Anregungseffizienz im grünen als im blauen Spektralbereich und ist damit wahrscheinlich mit $\lambda_0 = 1040$ nm besser anzuregen als mit $\lambda_0 = 800$ nm.

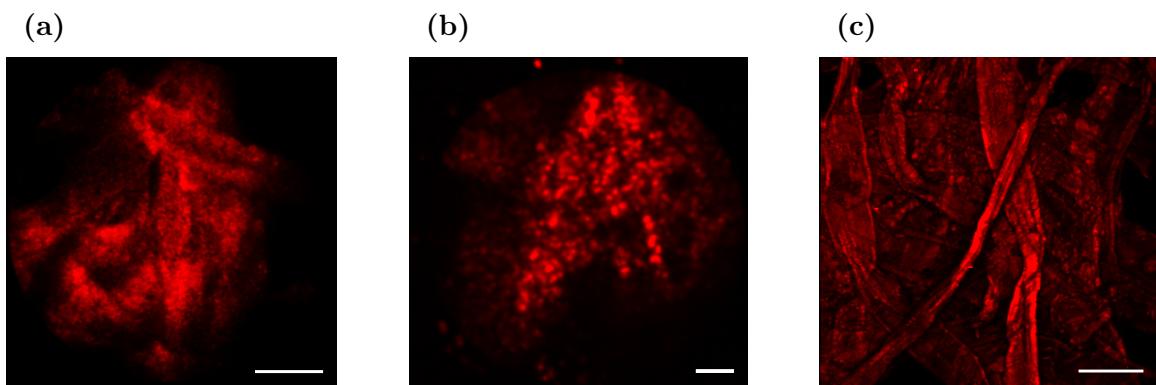


Abbildung 3.20 Papierfasern angereichert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Kresylviolett: (a) Referenzsystem (NA 0,75) bei einer Pulsennergie von 1,01 nJ und einer Pulsdauer von 460 fs; der Maßstab unten rechts entspricht 50 μm (b) Mikrooptik bei einer Pulsennergie von 0,19 nJ und einer Pulsdauer von 700 fs; Maßstab entspricht 20 μm (c) Zwei-Photonen-Mikroskop Aufnahme (20x, NA 0,40) bei einer Pulsenegie von 0,32 nJ und einer Pulsdauer von 320 fs; Maßstab entspricht 50 μm

Im Folgenden werden die mit dem *femto*TRAIN™ Yb Laser angeregten Fluoreszenzbilder gezeigt. Vergleichbare Messungen wurden ebenfalls mit dem Ti:Sa-Laser durchgeführt (siehe Thomsen u. a. [2010]). Die Bilder wurden durch ein 4,5 cm langes Faserbündel mit

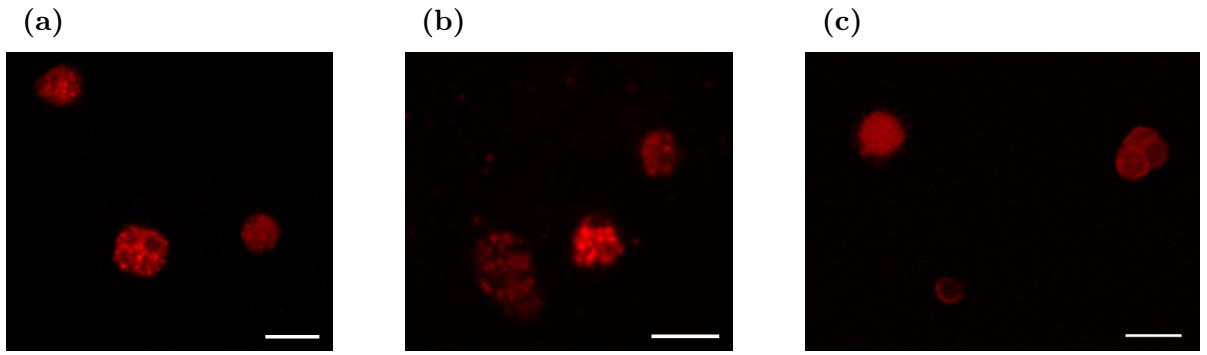


Abbildung 3.21 Pollenkörner: (a) Referenzsystem (NA 0,75) bei einer Pulsenegie von 1 nJ und einer Pulsdauer von 460 fs (b) Mikrooptik bei einer Pulsenegie von 0,31 nJ und einer Pulsdauer von 700 fs (c) Zwei-Photonen-Mikroskop Aufnahme (40x, NA 0,4) bei einer Pulsenegie von 0,14 nJ und einer Pulsdauer von 320 fs; Maßstab entspricht 30 µm

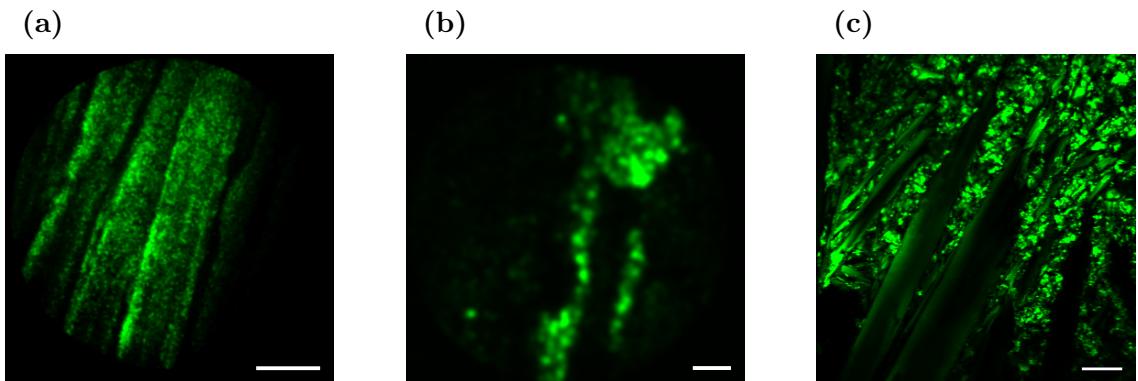


Abbildung 3.22 SHG-Signale von Harnstoffkristallstrukturen (a) Referenzsystem (NA 0,75) bei einer Pulsenegie von 0,24 nJ und einer Pulsdauer von 460 fs; Maßstab entspricht 50 µm (b) Mikrooptik bei einer Pulsenegie von 0,10 nJ und einer Pulsdauer von 700 fs; Maßstab entspricht 20 µm (c) Zwei-Photonen-Mikroskop Aufnahme (20x, NA 0,4) bei einer Pulsenegie von 0,04 nJ und einer Pulsdauer von 320 fs; Maßstab entspricht 50 µm

dem Referenzsystem und ein 6 cm langes Faserbündel mit der Mikrooptik aufgenommen, um möglichst kurze Pulse am Faserausgang zu gewährleisten. Die Pulsdauer an der Probe betrug für das Referenzsystem (460 ± 20) fs, für die Mikrooptik (700 ± 20) fs und ohne das Faserbündel (320 ± 10) fs. Von jeder Probe wurden drei Bilder angefertigt, mit dem Referenzsystem (NA 0,75), der Mikrooptik und zum Vergleich ohne das Faserbündel. Ohne das Faserbündel entspricht der Aufbau einem Zwei-Photonen-Mikroskop. Als Mikroskopobjektive wurden ein Objektiv mit einer 20x Vergrößerung (NA 0,4) und eines mit einer 40x Vergrößerung (NA 0,75) verwendet.

In Abbildung 3.20 sind Papierfasern, angereichert mit Kresylviolett, in Abbildung 3.21 Pollenkörner, in Abbildung 3.22 das SHG-Signal von Pollenkörnern und in Abbildung 3.23 das Fluoreszenzsignal eines Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Gewebeabschnitts einer Kaninchenblase gezeigt. In den Abbildungen ist die schlechtere laterale Auflösung der Mikrooptik zu sehen. Bis auf die Bilder von den Papierfasern (Abbildung 3.20) wurde die

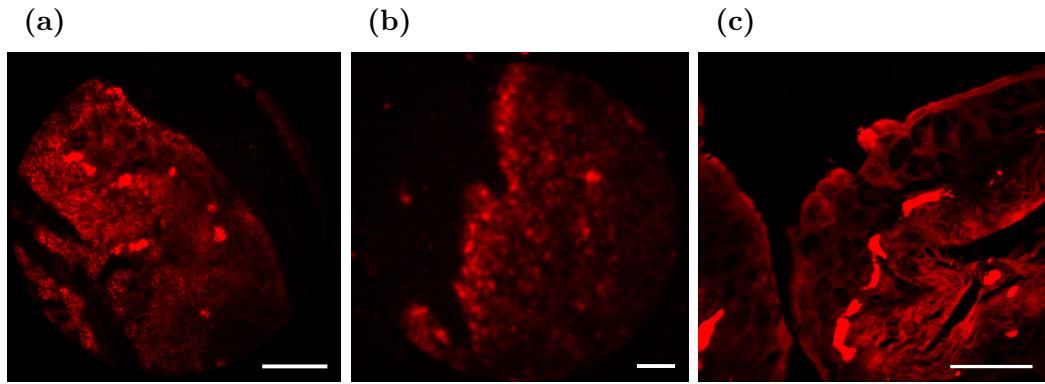


Abbildung 3.23 Hämatoxylin-Eosin gefärbter Gewebeschnitt einer Kaninchenblase (a) Referenzsystem (NA 0,75) bei einer Pulsenegie von 1,50 nJ und einer Pulsdauer von 470 fs; Maßstab entspricht 50 μm (b) Mikrooptik bei einer Pulsenegie von 1,52 nJ und einer Pulsdauer von 700 fs; Maßstab 20 μm (c) Zwei-Photonen-Mikroskopaufnahme (40x, NA 0,75) bei einer Pulsenegie an der Probe von 0,24 nJ und einer Pulsdauer von 320 fs; der Maßstab entspricht 50 μm

Verstärkung des Photomultipliers konstant gehalten. Zur Aufnahme der SHG-Signale der Harnstoffkristalle (Abbildung 3.22) wurde der Langpass ab 530 nm nicht verwendet, da das Signal bei 520 nm sonst abgeschnitten würde.

Tabelle 3.8 zeigt für die verschiedenen Proben die verwendeten mittleren Leistungen, die daraus resultierende Pulsenegie und die berechnete Peakleistung für die verschiedenen Systeme. Die verschiedenen Systeme sind einmal in Tabelle 3.8 a) Faserbündel und Referenzsystem, b) Faserbündel und Mikrooptik und c) ohne Faserbündel mit einem Mikroskopobjektiv aus dem Referenzsystem (NA 0,75). Wie zu erwarten, ist für die Zwei-Photonen-Anregung durch das Faserbündel eine größere mittlere Leistung und damit auch eine höhere Pulsenegie notwendig als für Zwei-Photonen-Mikroskop-Aufnahmen. Da die verwendeten Proben eine vergleichsweise inhomogene Struktur haben und somit auch die Fluoreszenzintensität unterschiedlich stark ist, wurde zusätzlich ein rot fluoreszierender Objekträger (Chroma Technology Corporation, Imtec Lane, Bellows Falls) als Fluoreszenzstandard verwendet. Der Fluoreszenzstandard wurde zusätzlich in einer Konfiguration gemessen, bei der das Fluoreszenzsignal nicht zurück in das Faserbündel geleitet wurde, sondern direkt am Ausgang des Referenzsystems gemessen wurde (vgl. Tabelle 3.8 FLS direkt). Bei gleicher Einstellung des PMT wurde die mittlere Leistung an der Probe angepasst, so dass für alle Systeme ein vergleichbares Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Da die Faserstruktur bei den Aufnahmen durch das Faserbündel das Fluoreszenzsignal verfälscht, wurde mit Hilfe einer Maskierung nur das Fluoreszenzsignal aus den einzelnen Faserkernen ausgewertet, um die Fluoreszenzintensität mit und ohne Faserbündel vergleichen zu können.

	Leistung [mW]			Pulsintensität [nJ]			Peakleistung [W]		
	a)	b)	c)	a)	b)	c)	a)	b)	c)
FLS	5,3	4,1	1,3	0,25	0,20	0,06	520	260	200
FLS direkt	3,3	-	1,3	0,16	-	0,06	320	-	200
Harnstoff	5,0	2,2	0,8	0,24	0,10	0,04	490	140	100
Pollen	21,0	6,5	2,9	1,00	0,31	0,14	2040	420	400
HE	31,6	32,0	5,0	1,50	1,52	0,24	3070	2050	700

Tabelle 3.8 Vergleich der Leistungen bzw. Pulsintensität und Peakleistung für a) das Referenzsystem (NA 0,75) b) die Mikrooptik und c) ohne Faserbündel. FLS steht für Fluoreszenzstandard

3.4.2 Diskussion

Die Aufnahmen durch das Faserbündel zeigen, dass eine Zwei-Photonen-Anregung und Detektion durch das Faserbündel möglich sind. Ein Zwei-Photonen-Endoskop auf Basis von Faserbündeln ist damit realisierbar. Allerdings gibt es Einschränkungen. Durch die Anregung und Detektion durch das Faserbündel entstehen Verluste, die durch eine höhere mittlere Leistung in der Anregung kompensiert werden müssen. Bei der Anregung entstehen Verluste durch die Faserstruktur, und verschlechterte PSF des Beleuchtungsstrahlengangs, wodurch das Anregungsvolumen vergrößert wird (siehe Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2). Da bei dem Rückweg das Fluoreszenzlicht wieder in die Fasern eingekoppelt werden muss, ist die Kollektion des Fluoreszenzlichtes ebenfalls weniger effizient. Dazu kommt noch eine ineffizientere Anregung aufgrund der längeren Pulsdauer an der Probe. Dieser Sachverhalt spiegelt sich darin, dass bei Aufnahmen durch das Faserbündel eine größere mittlere Leistung notwendig ist als für eine mikroskopische Aufnahme, auch bei einer kleineren numerische Apertur des Mikroskopobjektivs. Ein Vergleich der beiden distalen Optiken ergibt, dass mit der Mikrooptik tendenziell weniger mittlere Leistung notwendig war als mit dem Referenzsystem. Theoretisch sollte die Mikrooptik ein größeres Anregungsvolumen als das Referenzsystem besitzen, da durch den kleineren Vergrößerungsfaktor der Mikrooptik ($M_{distaleOptik} = 2$) im Vergleich zum Referenzsystems ($M_{distaleOptik} = 3$) der laterale Durchmesser des Anregungsvolumens größer ist und auch die axiale Auflösung schlechter ist. Damit ist eigentlich eine größere notwendige mittlere Leistung für die Mikrooptik zu erwarten. Allerdings können mit diesen Versuchen die Verluste in der Anregung und Detektion nicht getrennt werden. Damit könnte die Anregung mit der Mikrooptik weniger effizient sein als mit dem Referenzsystem, dafür aber die Fluoreszenzkollektion effizienter. Dafür spricht, dass für weniger fluoreszenzstarke Proben (HE-Schnitt) eine ähnliche mittlere Leistung zur Aufnahme für das Referenzsystem und die Mikrooptik notwendig war. Während die Anregungsverluste durch die Zwei-Photonen-Anregung quadratisch eingehen, sind Verluste in der Detektion konstant. Für das Referenzsystem ist eine direkte Kollektion des Fluoreszenzlichtes im kollimierten Strahlengang der distalen Optik möglich. Damit lassen sich Verluste in der Fluoreszenzdetektion minimieren (siehe Kapitel 3.1.3). Für den rot fluoreszierenden Objekträger von Chroma (Chroma-Plättchen) wurde ebenfalls die notwendige mittlere Leistung gemessen, indem die Fluoreszenz direkt und nicht über das Faserbündel gemessen wurde. Die Effizienz der Fluoreszenzkollektion kann im Fall der

Mikrooptik nicht so einfach gemessen werden, wie für das Referenzsystem.

Die mittlere Leistung am Ausgang des Faserbündels ist allerdings limitiert, da ab einer gewissen Leistung die Fasern kein Anregungslicht mehr transmittieren. Mit dem hier verwendeten Laser und Faserbündel ist die Leistung auf ca. 280 mW limitiert. Die Leistungsverluste der Mikrooptik bzw. des Referenzsystems ermöglichen damit eine mittlere Leistung von ca. 45 mW bzw. 34 mW an der Probe. Da das Fluoreszenzsignal von frischen Gewebeproben schwächer ist als für den HE-Schnitt, ist eine Aufnahme durch das Faserbündel von frischen gefärbten Gewebeproben durch das Faserbündel nicht möglich gewesen.

3.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf einem Faserbündel ein Aufbau realisiert, mit dessen Hilfe die Machbarkeit eines Zwei-Photonen-Endoskops gezeigt werden konnte. Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit sind:

- Erfolgreiche Einkopplung von ultrakurzen Laserpulsen in das Faserbündel
- Erfolgreiche Anregung von Zwei-Photonen-Fluoreszenz am Faserausgang
- Hohe axiale und laterale Auflösung um Zellen darzustellen
- Optimierung der Pulsdauer am Ausgang des Faserbündels
- Erfolgreicher Aufbau einer axial variablen Fokussiereinheit

Die erzielten Ergebnisse zeigen aber auch die Grenzen der Machbarkeit auf. Die Verluste der mittleren Laserleistung durch die zahlreichen optischen Komponenten erfordern leistungsstarke und stabile Laserquellen. Hinzu kommt, dass je mehr die Zentralwellenlänge ins Infrarote geht, desto mehr Verluste in Kauf zu nehmen sind, vor allem bei den kommerziell erhältlichen Mikroskopobjektiven. Allerdings sind leistungsstarke gepulste Laserquellen vergleichsweise teuer. Damit ist die Zwei-Photonen-Endoskopie im Vergleich zur Konfokal-Endomikroskopie sicherlich eine komplexere und auch teurere Technologie. Die Konfokal-Endomikroskopie ist allerdings bereits eine teure Technologie und muss sich in der klinischen Anwendung erst noch durchsetzen. Im Vergleich zur Konfokal-Endomikroskopie ist ein zu erwarteter Vorteil der Zwei-Photonen-Endoskopie die möglicherweise bessere Darstellung von tieferen Gewebeschichten. Da bei einigen Karzinomen eine Gewebeentartung in tieferen Schichten der Schleimhaut beginnt, würde bereits eine Darstellung bis ca. 300 µm Gewebetiefe einen klinischen Vorteil bedeuten. Ein weiterer Vorteil der Zwei-Photonen-Endomikroskopie ist ein möglicher markerfreier Einsatz durch die Darstellung von Autofluoreszenz oder von SHG-Signalen. Die eingeschränkte Zahl der klinisch zugelassenen Fluoreszenzfarbstoffe ist sicherlich eine Hemmschwelle bei der Verbreitung der Konfokal-Endomikroskopie. Um diesen Vorteil nutzen zu können, muss jedoch die klinische Aussagekraft der Darstellung von SHG-Signalen durch weitere und neuere Erfahrungen etabliert werden. Eine weitere Herausforderung ist, dass die Fluoreszenzintensität von endogenen Fluorophoren und von SHG Signalen meistens sehr viel schwächer als von exogenen Fluorophoren ist.

Technologisch muss die Zwei-Photonen-Endomikroskopie noch weitervorangetrieben werden, um diese Vorteile auch tatsächlich in einer endoskopischen Umsetzung nutzbar zu machen. Bei der Verwendung von Fasern ist die größte Problematik im Gewebe eine möglichst hohe lokal begrenzt Photonendichte zu erzeugen, um so eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Anregung von Zwei-Photonen-Fluoreszenz oder der Erzeugung von SHG-Signalen zu erhalten. Innerhalb der Arbeit konnten drei Parameter identifiziert werden, die bei einer zukünftigen Entwicklung optimiert werden müssen:

- die Spitzenleistungsdichte innerhalb des Faserkerns
- die Pulsdauer am Faserausgang
- die Fokussierung der Laserpulse im Gewebe

Diese Parameter sind jedoch nicht unabhängig von einander. Die transportierbare Leistungsdichte durch die Fasern ist begrenzt. Bei gepulsten Laserquellen ist der limitierende Parameter damit die Spitzenleistungsdichte. Zukünftige Entwicklungen sollten damit Ansätze verfolgen, bei denen die Spitzenleistungsdichte reduziert wird. Ein weiterer Vorteil bei einer Reduktion der Spitzenleistungsdichte sind die geringeren nichtlinearen Effekte, die eine Pulsverbreiterung hervorrufen. Die Reduktion der Spitzenleistungsdichte kann zum einen durch eine Erhöhung der Laserrepetitionsrate oder zum anderen durch die Vergrößerung des Modenfelddurchmesser der Faser erfolgen. Bei einer Erhöhung der Laserrepetitionsrate wird bei gleicher mittlerer Leistung die Spitzenintensität gesenkt. Bei einer Verringerung der Spitzenintensität ist allerdings auch mit einem schwächeren Fluoreszenzsignal zu rechnen. Um das gleiche Fluoreszenzsignal zu erhalten muss jedoch die mittlere Leistung nicht im gleichen Maße wie die Laserrepetitionsrate erhöht werden. Der Grund dafür ist die quadratische Abhängigkeit der Zwei-Photonen-Anregung von der eingestrahlten Spitzenintensität. Zur Erhöhung der Laserrepetitionsrate kann z.B. ein Pulssplitter [Ji, Magee und Betzig, 2008] verwendet werden. Die andere Möglichkeit, den Modenfelddurchmesser zu vergrößern, besitzt den Nachteil, dass der Fokussdurchmesser und damit das Anregungsvolumen größer wird. Weiterhin fällt die Möglichkeit der Verwendung von Faserbündeln weg.

Zur Optimierung der Pulsdauer am Faserausgang ist es neben der Reduzierung der nichtlinearen Effekte wichtig, die Verbreiterung der Pulsdauer auf Grund der Dispersionseffekte zu reduzieren. Die hier vorgestellten Maßnahmen, einen Gitterkompressor zu verwenden, sind zwar geeignet, aber die Leistungsverluste sollten weiter reduziert werden. Dabei ist zu beachten, dass bei einer variablen Leistung auch die Pulsmodulation variabel agieren muss. Dabei sollte die Entwicklung gechirpter Spiegel beobachtet werden, da diese derzeit zwar nur für kleine Glasstrecken eine effiziente Möglichkeit der Dispersionskompensation darstellen.

Bei der Fokussierung der Laserpulse sind weitere Optimierungen in der Mikrooptik notwendig. Achromatische Lösungen können neben der Reduktion des Anregungsvolumens auch die Effizienz in der Detektion der Fluoreszenz optimieren. Eine Abstimmung der Fasereigenschaften (numerische Apertur) auf die Mikrooptiken bietet weiters Optimierungspotenzial. In diese optischen Lösungen, entweder auf Basis von GRIN-Linsen oder anderen Mikrooptiken, könnte der in dieser Arbeit vorgestellten Verstellungsmechanismus integriert werden, um somit zukünftig eine 3D-Darstellung zu

ermöglichen.

A Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1	Prinzipieller Aufbau eines Konfokal- und Zwei-Photonen-Mikroskops	6
1.2	Vergleich der Einphotonen- und Zwei-Photonen-Anregung	7
1.3	Fokussierung nach einer Monomodefaser	8
1.5	Mikrooptik	10
1.6	Scannermechanismen in Endomikroskopie	11
1.7	Instantane Frequenz	16
1.8	Zeitliche und spektrale Profile von drei Gaußpulsen	20
1.9	Änderung der instantanen Frequenz bei Selbstphasenmodulation	27
1.10	Funktionsweise Prismen und Gitterkompressor	28
2.1	Aufbau des Zwei-Photonen-Endomikroskops	31
2.2	Strahlengang eines Mira 900	32
2.3	Aufbau Yanus-Scanner	34
2.4	Linsensystem zur Einkopplung in das Faserbündel	35
2.5	Verwendete Lichtwellenleiter	38
2.6	Mikrooptik von KST	39
2.7	Aufbau Gitterkompressor	43
2.8	Strahlengang des Autokorrelators	44
2.9	Brechungsindex für Quarzglas und Borosilikatglas	47
2.10	Konzept einer variablen Fokussiereinheit mit Nitinol	51
2.11	Skizze der Montage der Faser, Mikrooptik und des Schlittens	54
2.12	Stromverstärkung	55
3.1	Vergleich der Einkoppeloptik aus verschiedenen Linsen mit Hilfe von Zemax	60
3.2	Struktur von Pollenkörnern zur Beurteilung der lateralen Auflösung	63
3.3	Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der z-Position	64
3.4	Transmissionskurve des Einkoppelobjektivs (20x, NA 0,4)	67
3.5	Aufbau Nitinol	68
3.6	Verstellung Nitinol	69
3.7	Eichkurve	70
3.8	Verstellbarkeit der Fokussiereinheit	71
3.9	Reproduzierbarkeit der variablen Fokussiereinheit	72

3.10	Vergleich eines Gaußfits mit einem Sech ² -Fit einer Autokorrelation	76
3.11	Autokorrelation und Spektrum der Laserpulse	76
3.12	Autokorrelation am Faserausgang	78
3.13	Spektrum ungechirpter Pulse am Faserausgang	79
3.14	Vergleich der Autokorrelation direkt am Ausgang der Gitter für zwei verschiedene Gitterabstände	82
3.15	Autokorrelation und Spektrum negativ gechirpter Pulse am Faserausgang .	83
3.16	FWHM in Abhängigkeit vom Gitterabstand	84
3.17	Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung durch ein Faserbündel in Abhängigkeit von der Pulslänge	85
3.18	Simulation der Pulsdauer als Funktion des Gitterabstandes	91
3.19	Variation der Simulationsparameter	93
3.20	Papierfasern angereichert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Kresylviolett . . .	97
3.21	Pollenkörner	98
3.22	SHG-Signale von Harnstoffkristallstrukturen	98
3.23	Hämatoxylin-Eosin gefärbter Gewebeschnitt einer Kaninchenblase	99
A.1	Datenblatt Beugungsgitter	XI
A.2	Transmissionskurve für die Linsenbeschichtung	XII
A.3	Datenblatt Photomultiplier Modul	XII
A.4	Gaußfit der Autokorrelation	XIII

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über verschiedene Studien zur Anwendung der Endomikroskopie	5
1.2	Beispiele für Standard-Pulsprofile	18
2.1	Spezifikationen Mira 900 aus Handbuch Mira	33
2.2	Spezifikationen <i>femto</i> TRAIN™ Yb	33
2.3	Fasern	37
2.4	Auflistung und Bewertung einiger Eigenschaften der einzelnen Kompressorarten	42
2.5	Simulationsparameter für Quarzglas (SQ1) und Borosilikatglas (BK7)	47
2.6	Herstellung von 1,1 mM Stocklösung Kresylviolett	48
2.7	Anforderungen an eine variable Fokussiereinheit	49
2.8	Datenblatt für den Nitinoldraht	52
2.9	GRIN-Linsen-System	53
3.1	Transmissionsder einzelnen Komponenten	66
3.2	Vergleich der Laserparameter	75
3.3	Vergleich der gemessenen und simulierten Pulsdauer nach den Glasstäben	88
3.4	Verifizierung der Simulationen bei Verwendung einer 11 cm langen Monomodefaser	89
3.5	Verifizierung der Simulationen bei Verwendung einer Einzelfaser eines 5 cm langen Zwei-Glas-Faserbündels	89
3.6	Verifizierung der Simulationen einer Einzelfaser eines 64 cm langen Drei-Glas-Faserbündels	89
3.7	Vergleich der Simulation des Gitterkompressors mit der Messung	90
3.8	Vergleich der Leistungen	100
A.1	Simulationsparameter Fasern	XIV
A.2	Simulationsparameter Gitterkompressor	XIV

Literaturverzeichnis

- Adair, R., L. L. Chase und S. A. Payne (1989). „Nonlinear refractive index of optical crystals“. In: *Physical Review A* 39.5, S. 3337–3350.
- Agrawal, G. P. (2002). *Nonlinear fiber optics*. Optics and photonics. NOT IN FILE 3. ed., [Nachdr.] San Diego.
- Alvarez-Buylla, A., C. Y. Ling und J. R. Kirn (1990). „Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain“. In: *J Neurosci Methods* 33.2-3, S. 129–133.
- Asua, E. u. a. (2009). „Micropositioning control of smart shape-memory alloy-based actuators“. In: *Assem. Autom.* 29.3, S. 272–278.
- Baak, J. P. A. u. a. (1987). „Potential Clinical Uses of Laser Scan Microscopy“. In: *Appl Opt* 26.16, S. 3413–3416.
- Badreddine, R. J. u. a. (2008). „Confocal Laser Microscopy (CLM) Guided Endoscopic Mucosal Resection in Barrett's Esophagus with High Grade Dysplasia“. In: *Gastrointest Endosc* 67.5, AB179.
- Barretto, R. P., B. Messerschmidt und M. J. Schnitzer (2009). „In vivo fluorescence imaging with high-resolution microlenses“. In: *Nat Methods* 6.7, S. 511–512.
- Boyd, R. W. (2008). *Nonlinear Optics*. 3. Aufl. Elsevier, Acad. Press: Elsevier, Acad. Press.
- Buchner, A. M. u. a. (2010). „Comparison of probe-based confocal laser endomicroscopy with virtual chromoendoscopy for classification of colon polyps“. In: *Gastroenterology* 138.3, S. 834–842.
- Buchner, A. M. u. a. (2011). „The learning curve of in vivo probe-based confocal laser endomicroscopy for prediction of colorectal neoplasia“. In: *Gastrointest Endosc* 73.3, S. 556–560.
- Chennat, J. u. a. (2011). „Biliary Confocal Laser Endomicroscopy Real-Time Detection of Cholangiocarcinoma“. In: *Dig Dis Sci*.
- Clark, S. W., F. Ö. Ilday und F. W. Wise (2001). „Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser“. In: *Opt Lett* 26.17, S. 1320–1322.
- De Palma, G. D. u. a. (2010). „In vivo characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: a feasibility study to enhance routine endoscopy“. In: *Dig Liver Dis* 42.11, S. 791–797.
- Delaney, P. und M. Harris (2006). „Fiber-Optics in Scanning Optical Microscopy“. In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Hrsg. von James B. Pawley. 3. Aufl. New York: Springer US. Kap. 26, S. 501–515.
- Delaney, P. M., M. R. Harris und R. G. King (1993). „Novel microscopy using fibre optic confocal imaging and its suitability for subsurface blood vessel imaging in vivo“. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20.3, S. 197–198.
- Delker, A. (2010). „Femtosekundenlaserpulsoptimierung für Zwei-Photonen-Anwendungen in der medizinischen Optik“. Diplomarbeit.

- Denk, W., J. H. Strickler und W. W. Webb (1990). „Two-photon laser scanning fluorescence microscopy“. In: *Science* 248.4951, S. 73–76.
- Dickensheets, D. L. und G. S. Kino (1996). „Micromachined scanning confocal optical microscope“. In: *Opt Lett* 21.10, S. 764–766.
- Diels, J. C. und W. Rudolph (2006). *Ultrashort laser pulse phenomena*. 2. Aufl. Amsterdam: Academic Press.
- Dimitrow, E. u. a. (2009). „Sensitivity and Specificity of Multiphoton Laser Tomography for In Vivo and Ex Vivo Diagnosis of Malignant Melanoma“. In: *Journal of Investigative Dermatology* 129.7, S. 1752–1758.
- Duerig, T., A. Pelton und D. Stöckel (1999). „An overview of nitinol medical applications“. In: *Materials Science and Engineering: A* 273–275.0, S. 149–160.
- Dunbar, K. B., E. A. Montgomery und M. I. Canto (2008). „471 The Learning Curve of In Vivo Confocal Laser Endomicroscopy for Prediction of Barrett’s Esophagus“. In: *Gastroenterology* 134.4, Supplement 1, A–62–A–63.
- Engelbrecht, C. J. u. a. (2008). „Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo“. In: *Opt Express* 16.8, S. 5556–5564.
- Flusberg, B. A. u. a. (2005). „In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope“. In: *Opt Lett* 30.17, S. 2272–2274.
- Fork, R. I., O. E. Martinez und J. P. Gordon (1984). „Negative dispersion using pairs of prisms“. In: *Opt Lett* 9.5, S. 150–152.
- Fu, L. und M. Gu (2007). „Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy“. In: *Journal of Microscopy* 226.3, S. 195–206.
- Furuta, Y. u. a. (1985). „A new in vivo staining method, cresyl violet staining, for fiberoptic magnified observation of carcinoma of the gastric mucosa“. In: *Gastroenterol Jpn* 20.2, S. 120–124.
- George, M. und A. Meining (2003). „Cresyl violet as a fluorophore in confocal laser scanning microscopy for future in-vivo histopathology“. In: *Endoscopy* 35.7, S. 585–589.
- Giniunas, L., R. Juskaitis und S. V. Shatalin (1993). „Scanning fibre-optic microscope“. In: *Electronics Letters* 27.9, S. 724 –726.
- Gmitro, A. F. und D. Aziz (1993). „Confocal microscopy through a fiber-optic imaging bundle“. In: *Opt Lett* 18.8, S. 565.
- Göbel, W. u. a. (2004). „Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiber bundle and a gradient-index lens objective“. In: *Opt Lett* 29.21, S. 2521–2523.
- Goetz, M. u. a. (2009). „Simultaneous confocal laser endomicroscopy and chromoendoscopy with topical cresyl violet“. In: *Gastrointest Endosc.*
- Günther, U. u. a. (2010). „Diagnostic value of confocal endomicroscopy in celiac disease“. In: *Endoscopy* 42.3, S. 197–202.
- Haxel, B. R. u. a. (2010). „Confocal endomicroscopy: a novel application for imaging of oral and oropharyngeal mucosa in human“. In: *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267.3, S. 443–448.
- Helmchen, F. (2002). „Miniaturization of fluorescence microscopes using fibre optics“. In: *Experimental Physiology* 87.6, S. 737–745.
- Helmchen, F. und W. Denk (2005). „Deep tissue two-photon microscopy“. In: *Nature methods* 2.12, S. 932–940.
- Helmchen, F. u. a. (2001). „A Miniature Head-Mounted Two-Photon Microscope: High-Resolution Brain Imaging in Freely Moving Animals“. In: *Neuron* 31.6, S. 903–912.

- Hurlstone, D. P. u. a. (2007). „Confocal endomicroscopy in ulcerative colitis: Differentiating dysplasia associated lesional mass and adenoma-like mass“. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 5.10, S. 1235–1241.
- Hurlstone, D. P. u. a. (2008). „In vivo real-time confocal laser scanning endomicroscopic colonoscopy for the detection and characterization of colorectal neoplasia“. In: *Br J Surg* 95.5, S. 636–645.
- Ji, N., J. C. Magee und E. Betzig (2008). „High-speed, low-photodamage nonlinear imaging using passive pulse splitters“. In: *Nature methods* 5.2, S. 197–202.
- Ji, R. u. a. (2010). „Confocal laser endomicroscopy for diagnosis of Helicobacter pylori infection: a prospective study“. In: *J Gastroenterol Hepatol* 25.4, S. 700–705.
- Johansson, A. u. a. (2008). „Clinical optical diagnostics - Status and perspectives“. In: *Med Laser Appl* 23.4, S. 155–174.
- Kanai, M. (2005). „Condensing optical system, confocal optical system, and scanning confocal endoscope“. Schutzrecht US2005052753 (A1). Pentax Corporation und Optiscan Pty Ltd.
- Kane, S. und J. Squier (1997). „Grism-pair stretcher-compressor system for simultaneous second- and third-order dispersion compensation in chirped-pulse amplification“. In: *J. Opt. Soc. Am. B-Opt. Phys.* 14.3, S. 661–665.
- Kato, T., Y. Suetsugu und M. Nishimura (1995). „Estimation of Nonlinear Refractive-Index in Various Silica-Based Glasses for Optical Fibers“. In: *Opt Lett* 20.22, S. 2279–2281.
- Keller, H. E. (2006). „Objektive Lenses for Confocal Microscopy“. In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Hrsg. von James B. Pawley. 3. Aufl. New York: Springer US. Kap. 7, S. 145–160.
- Kiesslich, R. u. a. (2004). „Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo“. In: *Gastroenterology* 127.3, S. 706–713.
- Kiesslich, R. u. a. (2005). „Diagnosing Helicobacter pylori in vivo by confocal laser endoscopy“. In: *Gastroenterology* 128.7, S. 2119–2123.
- Kiesslich, R. u. a. (2006). „In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy“. In: *Clin Gastroenterol Hepatol* 4.8, S. 979–987.
- Kiesslich, R. u. a. (2007). „Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis“. In: *Gastroenterology* 132.3, S. 874–882.
- Kim, K. S. u. a. (1994). „Measurement of the nonlinear index of silica-core and dispersion-shifted fibers“. In: *Opt Lett* 19.4, S. 257.
- Knight, J. C. u. a. (1998). „Large mode area photonic crystal fibre“. In: *Electronics Letters* 34.13, S. 1347–1348.
- Knittel, J. u. a. (2001). „Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient index-lens system“. In: *Optics Communications* 188.5-6, S. 267–273.
- Kuiper, S. und B. H. W. Hendriks (2004). „Variable-focus liquid lens for miniature cameras“. In: *Applied Physics Letters* 85.7, S. 1128–1130.
- Lane, P. M. u. a. (2009). „Confocal fluorescence microendoscopy of bronchial epithelium“. In: *J Biomed Opt* 14.2, S. 024008.
- Le Harzic, R. u. a. (2008). „Nonlinear optical endoscope based on a compact two axes piezo scanner and a miniature objective lens“. In: *Opt Express* 16.25, S. 20588–20596.

- Lelek, M. u. a. (2007). „Coherent femtosecond pulse shaping for the optimization of a non-linear micro-endoscope“. In: *Opt Express* 15.16, S. 10154–10162.
- Lemire-Renaud, S. u. a. (2011). „Double-clad fiber with a tapered end for confocal endomicroscopy“. In: *Biomedical optics express* 2.11, S. 2961–2972.
- Leong, R. W. u. a. (2008). „In vivo confocal endomicroscopy in the diagnosis and evaluation of celiac disease“. In: *Gastroenterology* 135.6, S. 1870–1876.
- Liu, J. J. u. a. (2011). „Mind the gaps: confocal endomicroscopy showed increased density of small bowel epithelial gaps in inflammatory bowel disease“. In: *J Clin Gastroenterol* 45.3, S. 240–245.
- Lykhvar, O. (2004). „Entwicklung, Aufbau und Charakterisierung einer Mikrooptik für ein konfokales Mikroendoskop“. Diplomarbeit.
- Ma, N., G. Song und H. J. Lee (2004). „Position control of shape memory alloy actuators with internal electrical resistance feedback using neural networks“. In: *Smart Materials & Structures* 13.4, S. 777–783.
- Majewska, A., G. Yiu und R. Yuste (2000). „A custom-made two-photon microscope and deconvolution system“. In: *Pflugers Arch* 441.2-3, S. 398–408.
- Meining, A. u. a. (2007). „In vivo histopathology for detection of gastrointestinal neoplasia with a portable, confocal miniprobe: an examiner blinded analysis“. In: *Clin Gastroenterol Hepatol* 5.11, S. 1261–1267.
- Meining, A. u. a. (2008). „Detection of cholangiocarcinoma in vivo using miniprobe-based confocal fluorescence microscopy“. In: *Clin Gastroenterol Hepatol* 6.9, S. 1057–1060.
- Messerschmidt, B., B. L. McIntyre und S. N. HoudeWalter (1996). „Desired concentration-dependent ion exchange for micro-optic lenses“. In: *Appl Opt* 35.28, S. 5670–5676.
- Milam, D. (1998). „Review and Assessment of Measured Values of the Nonlinear Refractive-Index Coefficient of Fused Silica“. In: *Appl Opt* 37.3, S. 546–550.
- Mittag, J. (2009). „Konzeption, Realisierung und Charakterisierung einer miniaturisierten Verstelleinheit für ein hochauflösendes Endomikroskop“. Bachelorarbeit.
- Moulton, P. F. (1986). „Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃“. In: *JOSA B* 3.1, S. 125–133.
- Müller, M. (2007). *Experimente mit Nitinoldraht*. 1. Aufl. Poing: Franzis Verlag.
- Myaing, M. T., D. J. MacDonald und X. Li (2006). „Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope“. In: *Opt Lett* 31.8, S. 1076–1078.
- Paschotta, R. *Double-clad Fibers in Encyclopedia of Laser Physics and Technology*. Website. URL: <http://www.rp-photonics.com/lasers.html>.
- Pawley, J. B. (2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. NOT IN FILE 2. ed. New York: Springer US.
- Pech, O. u. a. (2008). „Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of early squamous cell carcinoma in the esophagus“. In: *Clin. Gastroenterol Hepatol* 6.1, S. 89–94.
- Planas, S. A. u. a. (1993). „Spectral Narrowing in the Propagation of Chirped Pulses in Single-Mode Fibers“. In: *Opt Lett* 18.9, S. 699–701.
- Rivera, D. R. u. a. (2011). „Compact and flexible raster scanning multiphoton endoscope capable of imaging unstained tissue“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108.43, S. 17598–17603.
- Rouse, A. R. u. a. (2004). „Design and demonstration of a miniature catheter for a confocal microendoscope“. In: *Appl Opt* 43.31, S. 5763–5771.

- Russell, P. (2003). „Photonic Crystal Fibers“. In: *Science* 299.5605, S. 358–362.
- Sabharwal, Y. S. u. a. (1999). „Slit-scanning confocal microendoscope for high-resolution in vivo imaging“. In: *Appl Opt* 38.34, S. 7133–7144.
- Salaun, M. u. a. (2010). „In vivo imaging of pulmonary alveolar proteinosis using confocal endomicroscopy“. In: *Eur Respir J* 36.2, S. 451–453.
- Saleh, B. E. A. und M. C. Teich (2008). *Grundlagen der Photonik*. 2. Aufl.
- Scheibe, S. (2009). „Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur Messung optischer Parameter mittels Optischer Kohärenztomographie“. Diplomarbeit.
- Schmidt, B. u. a. (2011). *LAB2-A virtual femtosecond laser lab*. URL: <http://www.lab2.de>.
- Sonn, G. A. u. a. (2009a). „Fibered confocal microscopy of bladder tumors: an ex vivo study“. In: *J Endourol* 23.2, S. 197–201.
- Sonn, G. A. u. a. (2009b). „Optical biopsy of human bladder neoplasia with in vivo confocal laser endomicroscopy“. In: *J Urol* 182.4, S. 1299–1305.
- Spence, D. E., P. N. Kean und W. Sibbett (1991). „60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser“. In: *Opt Lett* 16.1, S. 42–44.
- Stolen, R. H. und C. Lin (1978). „Self-phase-modulation in silica optical fibers“. In: *Physical Review A* 17.4, S. 1448–1453.
- Sung, K. B. u. a. (2002). „Fiber-optic confocal reflectance microscope with miniature objective for in vivo imaging of human tissues“. In: *IEEE Trans Biomed Eng* 49.10, S. 1168–1172.
- Szipöcs, R. u. a. (1994). „Chirped multilayer coatings for broadband dispersion control in femtosecond lasers“. In: *Opt Lett* 19.3, S. 201–203.
- Tan, J., P. Delaney und W. J. McLaren (2007). „Confocal endomicroscopy: a novel imaging technique for in vivo histology of cervical intraepithelial neoplasia“. In: *Expert Rev. Med. Devices* 4.6, S. 863–871.
- Tan, J. u. a. (2009). „Detection of cervical intraepithelial neoplasia in vivo using confocal endomicroscopy“. In: *BJOG* 116.12, S. 1663–1670.
- Theer, P., M. T. Hasan und W. Denk (2003). „Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier“. In: *Opt Lett* 28.12, S. 1022–1024.
- Thiberville, L. u. a. (2007). „In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy“. In: *Am. J Respir. Crit. Care Med.* 175.1, S. 22–31.
- Thiberville, L. u. a. (2009). „Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy“. In: *Eur Respir J* 33.5, S. 974–985.
- Thomsen, K. u. a. (2010). „Development of a confocal and two-photon endomicroscope – Preliminary results of qualitative evaluation“. In: *Med Laser Appl* 25.3, S. 166–172.
- Thong, P. S. u. a. (2007). „Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity“. In: *J Biomed Opt* 12.1, S. 014007.
- Treacy, E. (1969). „Optical pulse compression with diffraction gratings Optical pulse compression with diffraction gratings“. In: *Quantum Electronics, IEEE Journal of* 5.9, S. 454–458.
- Tsai, P. S. u. a. (2009). „Principles, Design, and Construction of a Two-photon Laser Scanning Microscope for In Vitro and In Vivo Brain Imaging“. In: *In vivo optical imaging*

- of brain function.* Hrsg. von R.D. Frostig. NOT IN FILE. Boca Raton: CRC Press. Kap. 6, S. 113–171.
- Venkatesh, K. u. a. (2010). „Role of confocal endomicroscopy in the diagnosis of celiac disease“. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51.3, S. 274–279.
- Wang, P. u. a. (2010). „Classification of histological severity of Helicobacter pylori-associated gastritis by confocal laser endomicroscopy“. In: *World J Gastroenterol* 16.41, S. 5203–5210.
- Washburn, B. R., J. A. Buck und S. E. Ralph (2000). „Transform-limited spectral compression due to self-phase modulation in fibers“. In: *Opt Lett* 25.7, S. 445–447.
- Wiesner, C. u. a. (2011). „Confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of urothelial bladder neoplasia: a technology of the future?“ In: *BJU Int* 107.3, S. 399–403.
- Williamson, J. P. u. a. (2009). „Quantifying tracheobronchial tree dimensions: methods, limitations and emerging techniques“. In: *Eur Respir J* 34.1, S. 42–55.
- Wu, K. u. a. (2011). „Dynamic Real-time Microscopy of the Urinary Tract Using Confocal Laser Endomicroscopy“. In: *Urology* 78.1, S. 225–231.
- Wu, Y. C. u. a. (2010). „Fiber-optic nonlinear endomicroscopy with focus scanning by using shape memory alloy actuation“. In: *J Biomed Opt* 15.6.
- Zhang, J.-N. u. a. (2008). „Classification of gastric pit patterns by confocal endomicroscopy“. In: *Gastrointest Endosc* 67.6, S. 843–853.
- Zheng, W. u. a. (2004). „Confocal endomicroscopic imaging of normal and neoplastic human tongue tissue using ALA-induced-PPIX fluorescence: a preliminary study“. In: *Oncol Rep.* 12.2, S. 397–401.
- Zipfel, W. R., R. M. Williams und W. W. Webb (2003). „Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences“. In: *Nat Biotechnol* 21.11, S. 1369–1377.

Ergänzungsmaterial



705 St. Paul Street
Rochester, New York 14605
Telephone: (585) 248-4100
Fax: (585) 248-4111
E-mail: gratings@newport.com
Web Site: <http://gratings.newport.com>

DIFFRACTION GRATING SPECIFICATION SHEET

Catalog no.	53-*351R		
Grating Description	600 g/mm plane ruled reflection grating with 13.9° nominal blaze angle		
Master no.	1530	Coating:	aluminum
Maximum Ruled Area:	102 x 102 mm	groove length:	102 mm
		ruled width:	102 mm
Efficiency Curve	spectral order: $m = 1$	polarization(s): S and P	
Remarks			

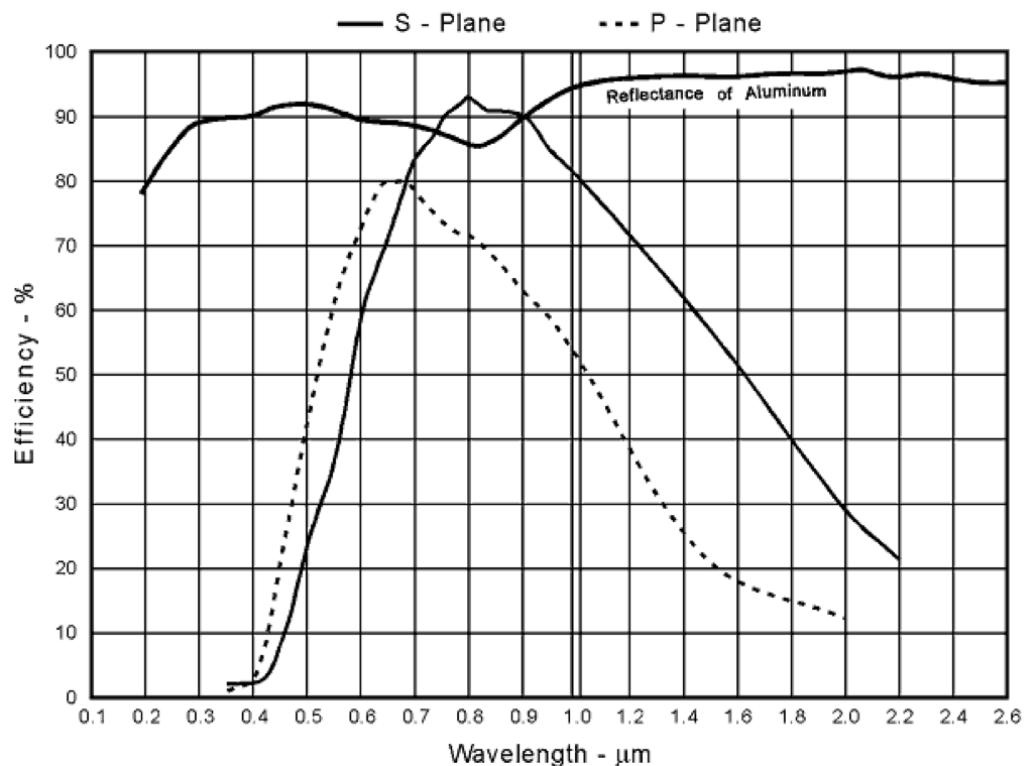


Abbildung A.1 Datenblatt Beugungsgitter; Effizienzkurve nahe Littrowanordnung

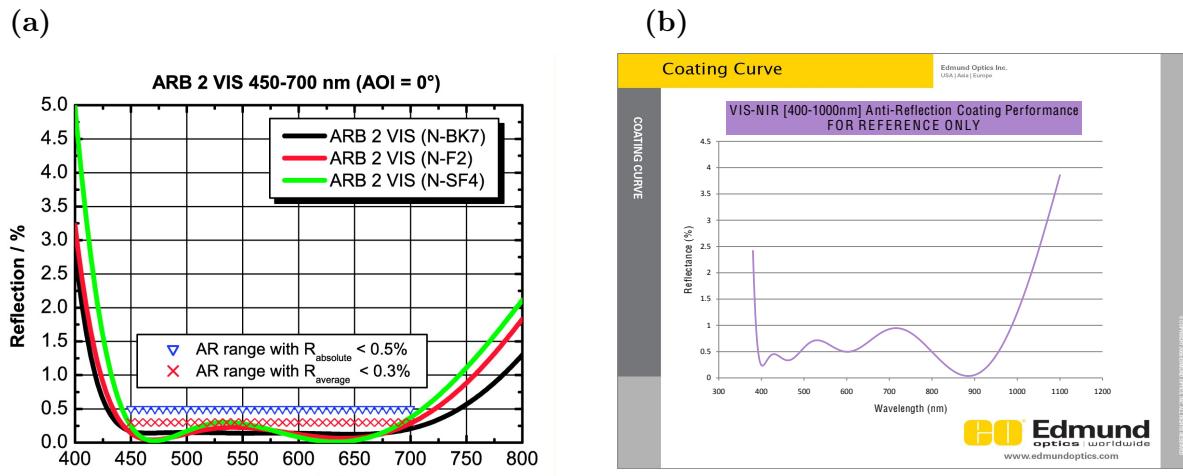


Abbildung A.2 Transmissionskurve für die Linsenbeschichtung

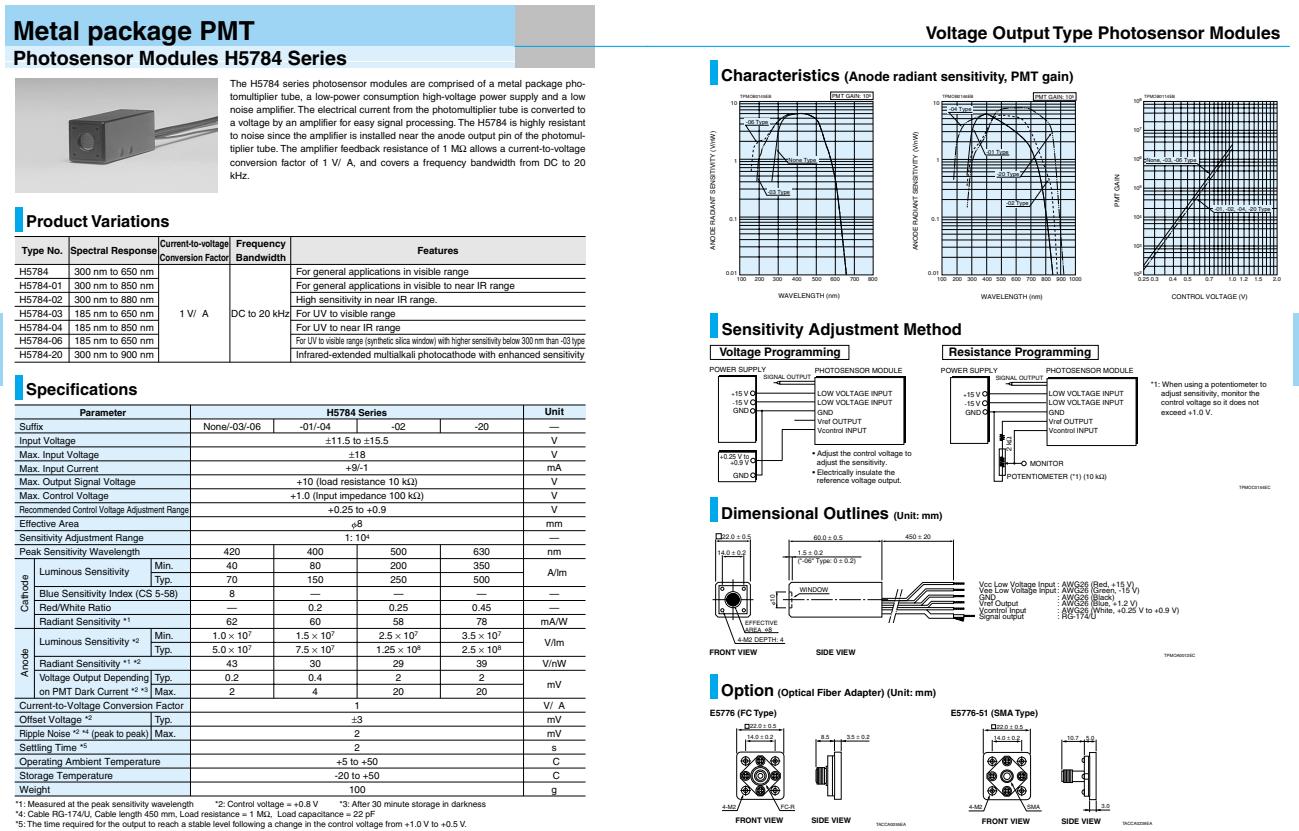


Abbildung A.3 Datenblatt Photomultiplier Modul

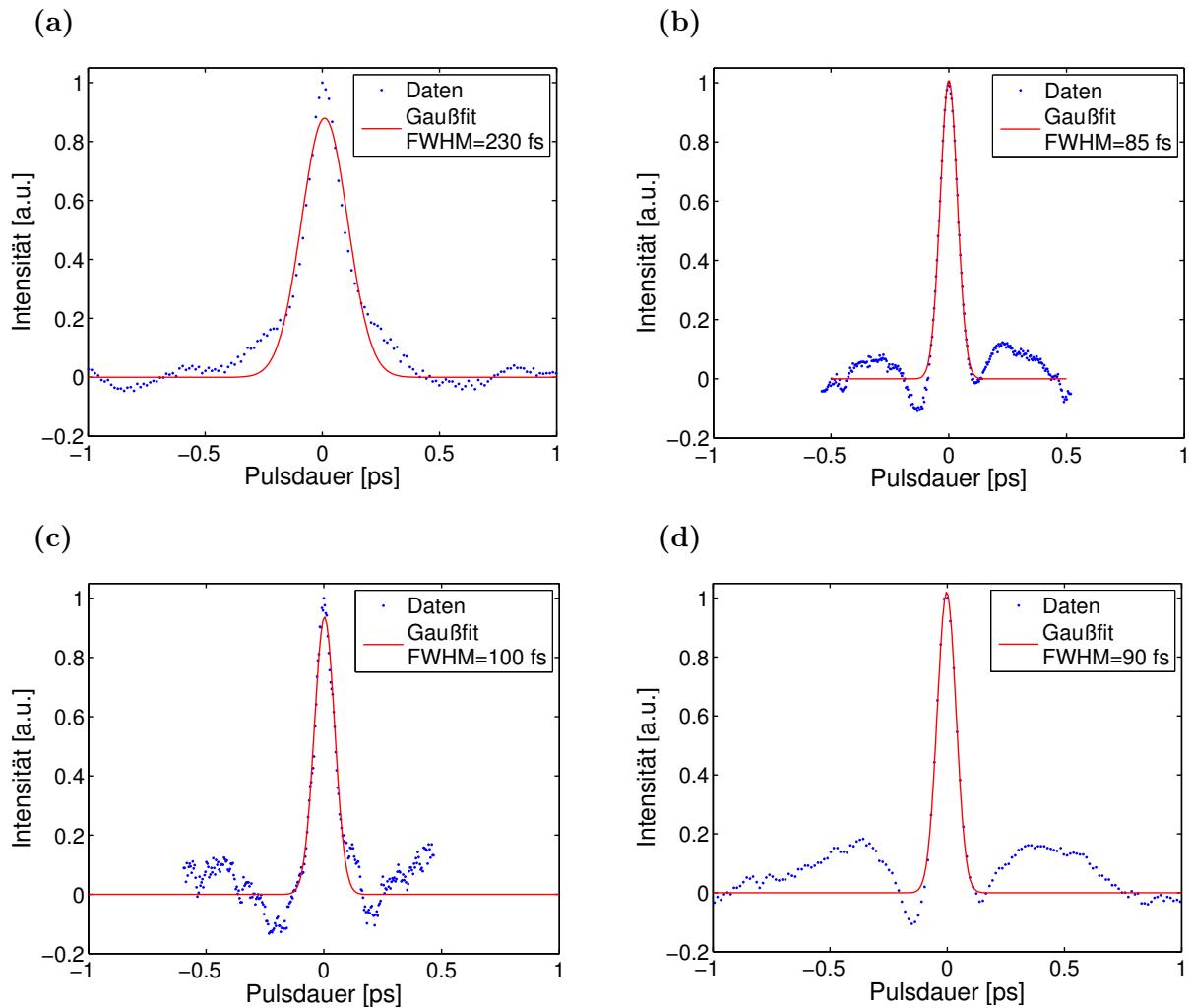


Abbildung A.4 Gaußfit der Autokorrelation

Faserparameter					
	Monomodefaser		Drei-Glas-Faserbündel		
Material	SQ1		BK7		
λ_0		800 nm	825 nm	800 nm	825 nm
$\Delta\lambda$		9 nm	10 nm	9 nm	10 nm
n_0		1,4533	1,4529	1,5108	1,5103
n_2		$2,6 \times 10^{-16}$ cm/W ²		$4,7 \times 10^{-16}$ cm/W ²	
\varnothing		5,1 µm	5,3 µm	3,5 µm	3,5 µm
A_{eff}		$2,043 \times 10^{-11}$ mm ²	$2,206 \times 10^{-11}$ mm ²	$0,962 \times 10^{-11}$ mm ²	$0,962 \times 10^{-11}$ mm ²

Tabelle A.1 Simulationsparameter Fasern

Gitterparameter	
Gitterkonstante	600 L/mm
Einfallswinkel	14°
Gitterabstand	variable
Gitterordnung	1

Tabelle A.2 Simulationsparameter Gitterkompressor

Abkürzungsverzeichnis

FWHM	Halbwertsbreite (full width at half maximum).
GDD	Gruppenlaufzeit-Dispersion oder Dispersion 2. Ordnung (group delay dispersion).
GVD	Gruppengeschwindigkeitsdispersion (group velocity dispersion).
MFD	Modenfelddurchmesser.
PSF	Punktspreizfunktion (point spread function).
SHG	Frequenzverdopplung (second harmonic generation).
SOD	Dispersion 2. Ordnung oder Gruppenlaufzeit-Dispersion (second order dispersion).
SPM	Selbstphasenmodulation.
SVEA	langsam variierende Einhüllende Näherung (slowly varying envelope approximation).
TOD	Dispersion 3. Ordnung (third order dispersion).
TWP	Zeit-Bandbreite-Produkt (time band width product).

Symbolverzeichnis

c	Vakuum-Lichtgeschwindigkeit.
$\Delta\lambda$	spektrale Breite bezogen auf die Zentralewellenlänge λ_0 .
$\Delta\nu_p$	spektrale Breite bezogen auf die Mittenfrequenz ν_0 .
$\Delta\omega$	die Bandbreite des Pulses.
E	elektrisches Feld.
ε_0	elektrische Feldkonstante (auch: Permittivität des Vakuums), $\varepsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \frac{\text{As}}{\text{Vm}}$.
τ_p	Halbwertsbreite (FWHM) des Intensitätsprofils eines Laserpulses.
λ_0	Zentralwellenlänge eines Laserpulses.
μ_0	magnetische Feldkonstante, auch Vakuumpermeabilität oder Induktionskonstante, $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{A}^2}$.
ν_0	Mittenfrequenz.
ω_0	zentrale Trägerfrequenz bzw. zentrale Kreisfrequenz.
φ	zeitliche Phase.
ψ	spektrale Phase.
v_g	die Gruppengeschwindigkeit.
v_{ph}	die Phasengeschwindigkeit.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne Dr. Herbert Stepp für die tatkräftige Unterstützung, die wertvollen Korrekturlesungen und die vielen Hilfestellungen am Laserforschungslabor danken. Sein Engagement, sein kritischer Geist aber auch seine menschliche Art machen ihn zu einem unverzichtbaren Teil des Laserforschungslabors. Dankbar bin ich auch meinem Doktorvater Professor Jochen Herms für die verständnisvolle und motivierende Betreuung der Doktorarbeit. Eine große Unterstützung war die liebevolle Leitung des Laserforschungslabors durch Dr. Reinhold Baumgartner und nachfolgend Dr. Ronald Sroka, die darüber hinaus stets für eine freundliche Atmosphäre und ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Gerne möchte ich auch Richard Meier danken. Leider war er nur den ersten Teil meiner Doktorarbeit am Laserforschungslabor. Er hat mir gerne und geduldig einen großen Teil seines Wissens weitergegeben und seine Betreuung war unverzichtbar für diese Arbeit. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und ehemaligen Kollegen des Laserforschungslabors, die stets ein offenes Ohr für Probleme hatten, immer hilfsbereit waren und mich mit kritischen Diskussionen weitergebracht haben, besonders Dr. Georg Hennig und Dr. Gesa Kniebühler. Gerne möchte ich auch Thomas Pongratz für die vielen Ideen und Umsetzungen danken. Diese Arbeit wäre sicherlich auch nicht möglich gewesen ohne die zahlreichen Anregungen und fachliche Diskussionen mit Professor Heinz Huber, Professor Pablo Loza-Alvarez, Dr. Werner Göbel und Dr. Christian Seebacher. Professor Heinz Huber hat mich zusätzlich mit einer Leihgabe eines Femtosekundenlaser unterstützt mit dem ein wesentlicher Teil dieser Arbeit erzielt wurde. Neben der fachlichen Unterstützung möchte ich mich aber auch für die seelische Unterstützung, meine Familie, insbesondere meinem Mann, und meiner Freunde bedanken, vor allem für die stetige Motivation nicht aufzugeben. Dr. Gesa Kniebühler möchte ich dafür besonders danken.

Eidesstattliche Versicherung

Thomsen, Katharina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Zwei-Photonen-Endoskopie

selbständige verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand