

**Kontraststeigerung
in der
optischen Kohärenztomographie
mittels
NIR-Farbstoffen**

von

Patrik Grychtol

Diplomarbeit in P H Y S I K

vorgelegt der

**Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen**

im September 2006

angefertigt am

Institut für Halbleitertechnik

bei

Prof. Dr. phil. Heinrich Kurz

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit im Rahmen der offiziellen Betreuung durch das Institut selbständig angefertigt habe und dass mir eine Arbeit gleichen Inhalts gegenwärtig nicht bekannt ist. Die angegebene Literatur ist repräsentativ für die verwendeten Quellen.

Aachen, den 6. September 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Interferometrie und OCT	3
2.1.1	Signalentstehung im Interferometer	4
2.1.2	Autokorrelation des Interferometers	5
2.1.3	Kreuzkorrelation des Interferometers	8
2.1.4	Vom Interferometer zur OCT	9
2.2	SOCT	12
2.2.1	Absorption	12
2.2.2	Streuung	14
3	Aufbau	16
3.1	Übersicht	16
3.2	Optik	17
3.2.1	Lichtquelle	17
3.2.2	Freistrahlaufbau und Strahlteiler	18
3.2.3	Linsen und Dispersionskompensation	18
3.3	Elektronik	21
3.3.1	Photodiode	22
3.3.2	Analoge Filter	22
3.3.3	Datenerfassung	23
3.3.4	Messung der Empfindlichkeit	24
3.3.5	Ansteuerplatine	24
3.4	Optomechanik	28
3.4.1	Probenarm	28
3.4.2	Referenzarm	32
4	Digitale Nachverarbeitung	49
4.1	Zeitaufgelöste Frequenzanalyse	50
4.2	Bilderzeugung in der SOCT	51
4.3	Technische Durchführung	54
5	SOCT-Messungen	56
5.1	Autokorrelation	56
5.2	Absorptionsfilter RG850	58
5.3	Farbstoff DY-781 und Agarosegel	68

Inhaltsverzeichnis

5.4	Anfärbung einer Blattader	76
5.5	Anfärbung von Zellsphäroiden	84
6	Zusammenfassung und Ausblick	97
6.1	Zusammenfassung	97
6.2	Ausblick	99
	Literaturverzeichnis	101
7	Danksagung	104

1 Einleitung

Die optische Kohärenztomographie, engl. „Optical Coherence Tomography“ (OCT), ist ein nicht-invasives interferometriebasiertes Bildgebungsverfahren, welches das aus einem Objekt zurückgestreute Licht zu Schnittbildern verarbeitet [1]. Dabei können alle Eigenschaften des Lichtes wie die Amplitude, Phase, Frequenz, Polarisation oder Kohärenz, die in Wechselwirkung mit der zu untersuchenden Probe treten, genutzt werden, um Informationen über sie zu extrahieren [2].

In Analogie zur Sonographie, in der man sich akustischer anstatt optischer Wellen zur Untersuchung bedient, besteht in der OCT ein Schnittbild (B-Scan) aus mehreren benachbarten Tiefenscans (A-Scan), welche die Intensität des in der Probe zurückgestreuten Lichtes aus einer bestimmten Tiefe widerspiegeln. Im Gegensatz zum Ultraschall hat Licht eine kleinere Wellenlänge und besitzt in Kombination mit dem Einsatz breitbandiger Lichtquellen spezielle Kohärenzeigenschaften. Dadurch ist es möglich, das Auflösungsvermögen der Sonographie (einige Millimeter) um mehr als eine Größenordnung zu übertreffen. Die Penetrationstiefe des Lichtes, und damit die maximale Bildgebungstiefe, ist auf wenige Millimeter begrenzt, im Gegensatz zu mehreren Zentimetern im Fall des Ultraschalls. Trotz der geringeren Eindringtiefe hat sich die OCT unter anderem aufgrund der überlegenen Auflösung in den letzten Jahren in einigen Bereichen der medizinischen Diagnostik etabliert.

Gegenüber anderen optischen Untersuchungsmethoden, wie z.B. der Mikroskopie, besitzt die OCT entscheidende Vorteile. Die Messung der senkrecht zur Oberfläche liegenden Schnittbilder kann *in vivo* durchgeführt werden. Diese nicht-invasive Darstellung ist bei einer Vielzahl diagnostischer Fragestellungen von herausragender Bedeutung, wie z.B. bei der Untersuchung der Netzhaut in der Ophthalmologie. Eine weitere Besonderheit der OCT ist, dass die axiale und laterale Auflösung voneinander entkoppelt sind, was dazu führt, dass auch hohe axiale Auflösungen mit niedriger Apertur zur Verfügung stehen. Je nach Bandbreite der eingesetzten Lichtquelle erreicht die OCT axiale Auflösungen im Bereich von 1 μm . Außerdem ist eine Empfindlichkeit von über 100 dB realisierbar. Dadurch lassen sich sogar schwach streuende Strukturen in einer stark streuenden Umgebung darstellen.

Aus ersten Untersuchungen geht hervor, dass der Einsatz der OCT neben anderen medizinischen Bereichen auch in der Tumordiagnostik sehr vielversprechend ist [3]. Insbesondere für die Bestimmung des Invasionsgrades einer Tumorerkrankung ist ein hochauflösendes, schnittbildgebendes Verfahren von größter Bedeutung. Problematisch für eine sichere Diagnostik ist hier jedoch der relativ geringe Kontrast im darzustellenden Gewebe. Dieser beruht üblicherweise auf den unterschiedlichen Streu- und Absorptions-

1 Einleitung

querschnitten verschiedenartiger Gewebestrukturen, welche oft nur schwach variieren. Der erzielbare Kontrast kann durch eine spektroskopische Auswertung des OCT-Signals verbessert werden [4]. Hierbei wird neben der zurückgestreuten Intensität auch die wellenlängenspezifische Absorption und Streuung des Lichtes innerhalb des Gewebes berücksichtigt und zur Steigerung des Kontrastes genutzt. Nur eine geringe Anzahl natürlich im Gewebe vorkommender Farbstoffe kommt bei den in der OCT genutzten Wellenlängen in Frage. Eine Alternative zu natürlichen Chromophoren bietet die gewebespezifische Anfärbung, wie sie auch in der Histologie genutzt wird, um den Kontrast zu steigern. Dazu eignen sich Farbstoffe, die innerhalb der spektralen Emissionsbandbreite der verwendeten OCT-Lichtquelle eine wellenlängenabhängige Absorptionsänderung besitzen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht, ob NIR-Farbstoffe als Marker zur Kontraststeigerung in der spektroskopischen optischen Kohärenztomographie (SOCT) eingesetzt werden können. Nach einer Erläuterung der theoretischen Grundlagen der OCT im zweiten Kapitel, wird im dritten Kapitel der in dieser Arbeit realisierte Freistrahl-OCT-Aufbau vorgestellt. Durch eine effiziente Dispersionskontrolle wird eine axiale Auflösung erreicht, die nur durch das Spektrum der vorhandenen Lichtquelle begrenzt ist. Es werden Maßnahmen zur Linearisierung der Spiegelbewegung im Referenzarm vorgestellt, die eine Steigerung des Kontrastes auch bei kleinen optischen Bandbreiten ermöglicht. Methoden zur Unterstützung einer möglichst exakten Frequenzanalyse wurden entwickelt, welche im vierten Kapitel der Arbeit näher beschrieben werden.

Im fünften Kapitel werden die mit dem aufgebauten OCT-System durchgeführten Messungen vorgestellt. Hierfür wurde zunächst die Frequenzanalyse des OCT-Interferenzsignals an einfachen Modellsystemen erprobt. Daraufhin wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen untersucht, ob eine Kontraststeigerung mittels NIR-Farbstoffen durch die SOCT in Sphäroiden (dreidimensionale Zellkulturen) aus verschiedenen Zelllinien zu erreichen ist. Kurze Zusammenfassungen am Ende eines längeren Abschnittes bzw. Kapitels dienen der Übersicht der Arbeit.

2 Grundlagen

Zu den folgenden Grundlagen der Interferometrie und der Lichtausbreitung in inhomogenen Gewebe, die das theoretische Fundament der OCT bzw. SOCT bilden, gibt es nicht nur zahlreiche Übersichtsartikel [2, 5, 6] sondern auch ausführliche Werke, wie z.B. „Principles of Optics“ von Born und Wolf [7]. Daher werden, anlehnend an die genannte Literatur, nur für diese Arbeit relevante Aussagen ohne genaue Herleitung getroffen.

2.1 Interferometrie und OCT

Im Gegensatz zur Sonographie, bei der man Schnittbilder aus der absoluten Laufzeit eines in das zu untersuchende Material eingestrahnten akustischen Pulses generiert, können die absoluten Laufzeiten der in der OCT eingesetzten Lichtpulse aufgrund der hohen Lichtgeschwindigkeit c zeitlich nicht erfasst werden.

Mit Hilfe eines Interferometers kann man jedoch die Laufzeitdifferenz zweier Strahlen vergleichen. Dazu teilt man zunächst den aus einer Lichtquelle stammenden Lichtstrahl mit einem Strahlteiler in einen Referenz- und einen Probenstrahl auf. Der Referenzstrahl wird an einem Spiegel, der in einem zum Strahlteiler fest definierten Abstand l_R steht, reflektiert, während der andere Teilstrahl mit der zu untersuchenden Probe in Wechselwirkung tritt, die im Abstand l_P zum Strahlteiler positioniert ist. Das zurückgeworfene Licht beider Teilstrahlen wird am Strahlteiler wieder überlagert und mit einem Photodetektor aufgezeichnet. Während einer Messung wird der Referenzspiegel bewegt, wodurch variable Laufzeitunterschiede τ zwischen den beiden Lichtpulsen erzeugt werden. Setzt man nun breitbandige Lichtquellen mit kurzen Kohärenzlängen ein, so übersetzt sich die Messung der Laufzeitdifferenz in eine absolute Positionsbestimmung. Auf diesem Messprinzip basiert die OCT.

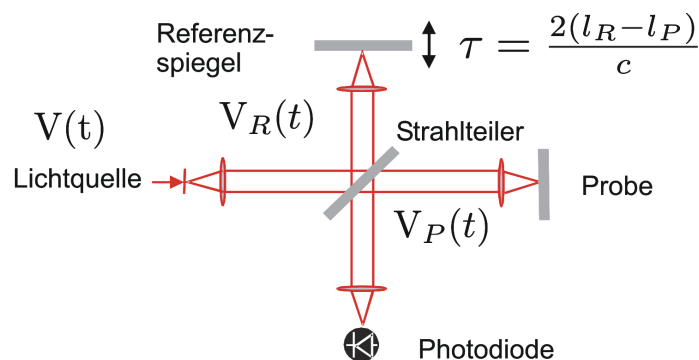


Abbildung 2.1.1: Aufbau eines Michelson-Interferometer

Die hier skizzierten Grundlagen der interferometrischen Messung können anhand der schematischen Abbildung 2.1.1 eines Michelson-Interferometers nachvollzogen werden. Des Weiteren sollen diese Kenntnisse im Rahmen einer mathematischen Behandlung der auf die OCT bezogenen Interferometrie vertieft werden.

2.1.1 Signalentstehung im Interferometer

Zunächst wird von den Maxwellgleichungen ausgegangen, welche die Basis der Ausbreitung von elektromagnetischen Feldern und Wellen bilden. Daraus resultiert folgende Wellengleichung, welche die Ausbreitung des elektrischen Feldes \mathbf{E} im Vakuum beschreibt:

$$\nabla^2 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t)}{\partial t^2} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{c^2} = \mu_0 \varepsilon_0 . \quad (2.1.1)$$

Eine mögliche Lösung dieser Gleichung ist die ebene Welle, die wir im Folgenden als linear polarisiert annehmen. Darüber hinaus interessiert man sich nur für die Feldverteilung in der Photodiodeebene, so dass sich ein skalarer, aber komplexer Ansatz für das elektrische Feld ohne räumliche Abhängigkeit als sinnvoll herausstellt:

$$E(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} df \tilde{E}(f) e^{-2\pi i f t} = FT^{-1}\{\tilde{E}(f)\}, \quad (2.1.2)$$

wobei der letzte Teil der Gleichung, der Fourierdarstellung des elektrischen Feldes $E(t)$ entspricht. Weiterhin wird zur Beschreibung des Interferometers ein aus der Signalübertragung bekannter Ansatz gewählt, in dem das elektrische Feld als analytisches Signal $V(t)$ geschrieben werden kann. Dieses ist dadurch definiert, dass seine Fouriertransformation keine negativen Beiträge besitzt. Es gilt folgende Beziehung:

$$V(t) = 2 \int_0^{+\infty} df \tilde{E}(f) e^{-2\pi i f t} = A(t) e^{i\Phi(t) - 2\pi i f_C t}. \quad (2.1.3)$$

$A(t)e^{i\Phi(t)}$ kann als komplexe Einhüllende des Pulses aufgefasst werden, welcher mit der Mittenfrequenz f_C des Spektrums von $V(t)$ moduliert ist. Im Falle einer monochromatischen, ebenen Welle ist die Einhüllende konstant und entspricht der Amplitude des Feldes. Die Formulierung des Feldes über die Amplitude $A(t)$ und die Phase $\Phi(t)$ ist jedoch nur im quasimonochromatischen Fall zutreffend, wenn die komplexwertige Einhüllende im Bezug zur Mittenfrequenz f_C vergleichsweise langsam variiert. Diese als SVE-Näherung (Slowly Varying Envelope) bekannte Approximation ist hier anwendbar, da der Puls (ca. 18 fs) des eingesetzten kernlinsen-modengekoppelten Titan-Saphir Lasers (Ti:Saphir) noch genügend Zyklen des elektrischen Feldes enthält. Die augenblickliche Intensität I_{PD} am Ort der Diode ist dann:

$$I_{PD}(t) = V^*(t)V(t). \quad (2.1.4)$$

Indem man das Feld bzw. Signal der Lichtquelle $V(t)$ mit Hilfe des Strahlteilers in ein Referenz- $V_R(t)$ und ein Probensignal $V_P(t)$ aufteilt und diese Signale mit einem zeitlichen Versatz von $\tau = 2 \frac{l_R - l_P}{c}$ auf der Photodiode überlagert, kann die gemessene

Intensität, unter der Annahme von perfekter räumlicher Kohärenz des Lichtes im Interferometer, als Ensemble-Mittel des Quadrates der Summe der Teilsignale beschrieben werden:

$$\begin{aligned} I_{PD}(\tau) &= \langle (V_R(t + \tau) + V_P(t))^*(V_R(t + \tau) + V_P(t)) \rangle \\ &= \langle I_P(t) \rangle + \langle I_R(t) \rangle + 2\text{Re}[\langle V_P^*(t)V_R(t + \tau) \rangle]. \end{aligned} \quad (2.1.5)$$

Da sich die Aufnahmezeit der Diode im Allgemeinen in der Größenordnung von mehreren Millisekunden bewegt, kann die Integrationszeit unter Berücksichtigung der kurzen Pulsdauer und einer Repetitionsrate von etwa 1 GHz des Ti:Saphir als unendlich angenommen werden.

Die ersten beiden Summanden der Gleichung repräsentieren die mittleren Intensitäten der Teilstrahlen, die aus dem Referenz- und Probenarm zurückkommen. Diese beiden Intensitäten sind als zeitlich konstant zu betrachten und machen sich als Gleichanteil im Detektorsignal bemerkbar. Den dritten Summanden bezeichnet man auch als Interferenzterm G_{PR} , welcher sich mit den ersten beiden Termen zum Interferogramm überlagert. G_{PR} kann als AC-Anteil des Photostroms $i(\tau)$ bzw. der Ausgangsspannung $U(\tau)$ eines nach der Photodiode geschalteten Verstärkers aufgefasst werden, wenn eine heterodyne Detektionstechnik eingesetzt wird. Dabei erhält man die AC-Komponente mit Hilfe eines analogen Bandpasses, so dass für die Spannung bzw. den Strom gilt:

$$U(\tau) \propto i(\tau) = \frac{q_e \eta}{h f_0} \int_{\text{Detektorfl}} d^2 \mathbf{r} I_{PD}(\mathbf{r}, \tau) \quad (2.1.6)$$

Hierbei ist q_e die elektrische Elementarladung, η die Quanteneffizienz der Photodiode und h das Plancksche Wirkungsquantum. Es wird außerdem angenommen, dass die Detektorfläche planparallel zur Wellenfront des Feldes steht.

2.1.2 Autokorrelation des Interferometers

Bei genauerer Betrachtung des Interferenzterms zeigt sich, dass man einen Beitrag zum Interferenzsignal nur genau dann erhält, wenn der optische Weglängenunterschied zwischen den auf dem Photodetektor überlagerten Signalen aus dem Referenz- und Probenarm innerhalb der noch zu definierenden Kohärenzlänge l_c liegt. Diese ist abhängig vom Spektrum der eingesetzten Lichtquelle. G_{PR} lässt sich darstellen als der zweifache Realteil der zeitlichen Kreuzkorrelation der miteinander interferierenden analytischen Signale aus Referenz- und Probenarm bzw. dem zweifachen Realteil der Kohärenzfunktion Γ_{PR} :

$$\begin{aligned} G_{PR}(\tau) &= 2\text{Re}[\langle V_P^*(t)V_R(t + \tau) \rangle] = 2\text{Re}[\Gamma_{PR}(\tau)] \\ &= 2\sqrt{\langle I_P(t) \rangle \langle I_R(t) \rangle} |\gamma_{PR}(\tau)| \cos(\alpha_{PR} - \delta_{PR}(\tau)). \end{aligned} \quad (2.1.7)$$

Hier stellt γ_{PR} den komplexen Grad der Kohärenz dar, $\delta_{PR}(\tau) = 2\pi f_C \tau$ entspricht der Phasendifferenz zwischen Referenz- und Probenarm und α_{PR} ist ein konstanter Phasenterm, der die Reflektivitäten des Strahlteilers und der Spiegel berücksichtigt.

2 Grundlagen

Es ist zu beachten, dass nur der Realteil von $\Gamma_{PR}(\tau)$ gemessen wird, so dass man das gemessene Signal $G_{PR}(\tau)$ analytisch mit der Hilberttransformierten HT zur komplexen Kohärenzfunktion ergänzen muss.

$$\Gamma_{PR}(\tau) = \frac{1}{2}(G_{PR}(\tau) + iHT\{G_{PR}(\tau)\}) = A_{\Gamma}(\tau)e^{i\Phi_{\Gamma}(\tau)} \quad (2.1.8)$$

Die Hilberttransformation ist eine lineare und zeitinvariante Integraltransformation, die in der Signalverarbeitung dazu genutzt wird, um aus einem realwertigen Signal das analytische Signal zu gewinnen, d.h. den Imaginärteil zu ergänzen. Damit kann man mit relativ geringem Aufwand das Signal demodulieren, sprich den Betrag und die Phase des Signals extrahieren. Hier heißt das konkret:

$$A_{\Gamma}(\tau) = |\Gamma_{PR}(\tau)| = \frac{1}{2}\sqrt{(G_{PR}(\tau))^2 + (HT\{G_{PR}(\tau)\})^2} \quad (2.1.9)$$

$$\Phi_{\Gamma} = \arctan\left[\frac{HT\{G_{PR}(\tau)\}}{G_{PR}(\tau)}\right]. \quad (2.1.10)$$

Sind die Interferometerarme von zwei perfekten Spiegeln abgeschlossen, so vereinfacht sich die Kreuzkorrelation zu einer Autokorrelation und man kann G_{RR} als Impulsantwort des Interferometers auffassen. Über $A_{\Gamma}(\tau) = |\Gamma_{RR}(\tau)|$ lässt sich dann die Einhüllende bestimmen.

Mit Hilfe des Wiener-Khintchine-Theorems kann des Weiteren gezeigt werden, dass die spektrale Leistungsdichte der Kreuzkorrelation W_{PR} als Fouriertransformation der Kohärenzfunktion geschrieben werden kann:

$$W_{PR}(f) = FT\{\Gamma_{PR}(\tau)\}. \quad (2.1.11)$$

Im oben genannten Idealfall ergibt sich für die spektrale Leistungsdichte der Lichtquelle

$$S_{Quelle}(f) = FT\{\Gamma_{RR}(\tau)\}. \quad (2.1.12)$$

Das Spektrum des in dieser Arbeit verwendeten Ti:Saphir-Lasers lässt sich durch ein gaußförmiges Spektrum mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von Δf approximieren. Obwohl der Secans Hyperbolicus eine genauere Beschreibung liefert, wird aus rechen-technischen Gründen die Einfachheit des Gaußprofils bevorzugt:

$$S_{Ti:Saphir}(f) \propto \exp\left[-4\ln(2)\frac{(f - f_C)^2}{\Delta f^2}\right]. \quad (2.1.13)$$

Ein gaußförmiges Spektrum ergibt über die inverse Fouriertransformation eine gaußförmige Kohärenzfunktion Γ_{RR} und Einhüllende A_{Γ} :

$$\Gamma_{RR}(\tau) \propto \exp\left[-\pi^2\frac{\Delta f^2}{4\ln 2}\tau^2 - 2\pi if_C\tau\right] \quad (2.1.14)$$

$$A_{\Gamma}(\tau) \propto \exp\left[-\pi^2\frac{\Delta f^2}{4\ln 2}\tau^2\right]. \quad (2.1.15)$$

Hierbei verhalten sich die Bandbreiten bzw. FWHM im Zeit- und Frequenzbereich antiproportional zueinander, was die Energie- und Zeitunschärfe nach Heisenberg widerspiegelt. Als Kohärenzlänge l_c definiert man nun das FWHM der Einhüllenden bezogen auf den Weglängenunterschied zwischen Proben- und Referenzarm in Abhängigkeit der eingesetzten Zentralwellenlänge λ_C bzw. der Bandbreite $\Delta\lambda$ des Lasers. Diese ergibt sich durch elementare Umformungen zu

$$l_c = c\tau_c = \frac{4c \ln 2}{\Delta f} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_C^2}{\Delta\lambda} \approx 0.44 \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda}. \quad (2.1.16)$$

In Abbildung 2.1.2 sind die Impulsantworten G_{RR} für zwei verschiedene Laser in Abhängigkeit der Referenzspiegelposition gezeigt. Dieser Vergleich veranschaulicht deutlich den Unterschied zwischen dem bereits erwähnten Ti:Saphir-Laser mit einer Kohärenzlänge von etwa $3,5 \mu\text{m}$ und einem Helium-Neon Laser (HeNe) mit einer Kohärenzlänge von mehreren Zentimetern. Die Abszisse in Abbildung 2.1.2 (b) ist aus Gründen der Darstellung gestreckt. Die Amplitude dieses Interferenzsignals fällt erst nach mehreren Zentimetern auf die Hälfte ab.

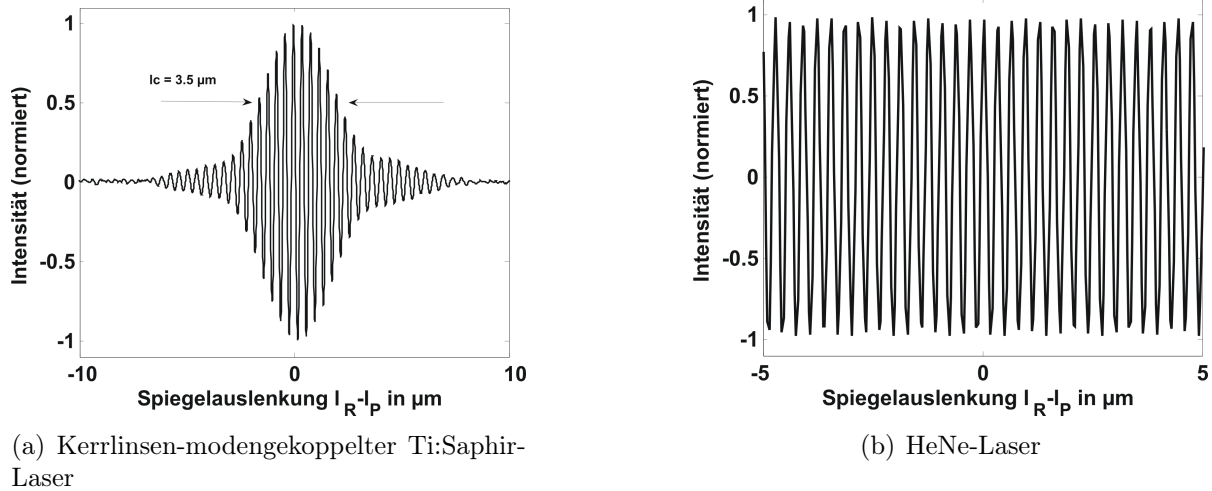


Abbildung 2.1.2: **Im Michelson-Interferometer gemessene Autokorrelation G_{RR} für zwei Laser unterschiedlicher optischer Bandbreite**

Stellt man sich eine Probe vor, die aus vielen übereinander liegenden Schichten mit unterschiedlichen Reflektivitäten und unterschiedlichen Dicken besteht und führt man diese in den Probenarm des Interferometers ein, so erhält man unter Vernachlässigung von Vielfachreflexionen zwischen den Schichten bei jedem Schichtübergang einen Rückreflex des Lichtes, der genau dann mit dem Licht aus dem Referenzarm einen Beitrag zu G_{PR} liefert, wenn die Weglängendifferenz zwischen den beiden Lichtpulsen innerhalb der Kohärenzlänge l_c liegt. Es wird sofort klar, dass das Auflösungsvermögen des Interferometers mit der Kohärenzlänge l_c zu assoziieren ist, da man zwei Schichten noch genau dann voneinander unterscheiden kann, wenn diese mindestens einen Abstand von l_c besitzen.

2.1.3 Kreuzkorrelation des Interferometers

Ersetzt man diese Vorstellung der Probe durch ein Objekt, das aus einer Vielzahl sphärischer Streuzentren, die in einem Volumen inhomogen verteilt sind, so kann man unter linearen Bedingungen die von der Probe zurückgestreute Welle $V_P(t)$ als Überlagerung von unterschiedlich starken und laufzeitverschobenen Teilwellen mit einer komplexen Amplitude $V(\tau)h(t - \tau)$ betrachten. Anders ausgedrückt kann das Interferometer auch als ein lineares translationsinvariantes System aufgefasst werden, so dass man die zurückgeworfene Welle aus dem Probenarm als Faltung der Welle aus dem Referenzarm mit der Impulsantwort der Probe bzw. einer komplexen Amplitudenrückstreuungsfunktion $h(t)$ beschreibt [8]:

$$V_P(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} d\tau V(\tau)h(t - \tau) = V_R(t) \otimes h(t). \quad (2.1.17)$$

Die Amplitudenrückstreuungsfunktion enthält sowohl die Proben- als auch die Interferometereigenschaften und gibt die Phase und den Betrag der mit dem Laufzeitunterschied τ gegenüber der Welle aus dem Referenzarm verzögerten Welle aus dem Probenarm an.

Es wurde in [9] gezeigt, dass $h(t)$ in eindeutigem Bezug zum Reflektivitätsprofil der Probe steht. Das in diesem Artikel vorgestellte lineare Gewebemodell beschreibt die Streuung und Absorption im Gewebe als Verlust der Kohärenz des Probenstrahls, welche über die Faltung der Kohärenzfunktion der Lichtquelle Γ_{RR} mit der Amplitudenrückstreuungsfunktion $h(t)$ ausgedrückt wird. Dieses durch Monte Carlo Simulationen unterstützte Modell kommt der Realität im Vergleich zu den ersten Konzepten, die das Gewebe als schwach reflektierende, übereinander liegende Schichten betrachtet, näher, indem es das Gewebe als diskontinuierliche Struktur von Brechungsindizes auf einer Wellenlängenskala auffasst. Definiert man die Frequenzantwort der Probe $H(f)$ als Fouriertransformation von $h(t)$, so dass:

$$H(f) = FT\{h(t)\} \quad (2.1.18)$$

ist, kann gezeigt werden, dass die Kohärenzfunktion Γ_{PR} als Kohärenzfunktion der Autokorrelation gefaltet mit der Amplitudenrückstreuungsfunktion bzw. im Fourierraum als Multiplikation des Leistungsdichtespektrums der Lichtquelle mit der Frequenzantwort der Probe geschrieben werden kann:

$$\Gamma_{PR}(\tau) = \langle V_P^*(t)V_R(t + \tau) \rangle = \int_0^\infty df |\tilde{E}(f)|^2 H(f) e^{2\pi i f \tau} \quad (2.1.19)$$

$$\begin{aligned} &= \Gamma_{Quelle}(\tau) \otimes h(\tau) = FT^{-1}\{S_{Quelle}(f)H(f)\} \\ \Rightarrow W_{PR}(f) &= S_{Quelle}(f)H(f). \end{aligned} \quad (2.1.20)$$

Wenn man den Spiegel im Referenzarm nun mit einer Geschwindigkeit v bewegt, anstatt die Verzögerung als quasi-statisch zu behandeln, wird eine weitere Phase in die Kohärenzfunktion eingeführt. Diese bestimmt die Trägerfrequenz des gemessenen Interferogramms und macht eine Trennung des AC-Terms vom Gleichanteil des Signals mit

Hilfe eines analogen Bandpasses möglich. Darüber hinaus wird dadurch der Interferenzterm aus dem $1/f$ -Rauschen der Lichtquelle gehoben. Da sich der Spiegel in Luft bewegt, muss der Brechungsindex nicht berücksichtigt werden. Die neue Trägerfrequenz f_T ergibt sich aus der Dopplerverschiebung:

$$f_T = 2 \frac{v}{\lambda_C}. \quad (2.1.21)$$

Daraus folgt für die Kohärenzfunktion und das Spektrum:

$$\Gamma_{PR}(t) = \Gamma_{PR}(\tau) \exp(-2\pi i f_t t) \Rightarrow W_{PR}(f - f_t) = S_{Quelle}(f) H(f) \otimes \delta(f - f_t). \quad (2.1.22)$$

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Interferometer mit einem aus der Signalübertragung bekannten Ansatz treffend beschrieben werden kann. Hierbei entspricht das Interferometer einem linearen System mit der Impulsantwort G_{RR} (bzw. im Komplexen Γ_{RR}), welches auf die Probe reagiert. Über die Amplitudenrückstreuungsfunktion $h(\tau)$, die Impulsantwort der Probe, können Aussagen über die Eigenschaften der Probe getroffen werden. Dabei wird anhand von Gleichung 2.1.19 deutlich, dass sich der Frequenzraum aufgrund des multiplikativen Zusammenhangs zwischen der Frequenzantwort der Probe und des Spektrums der Lichtquelle für eine genauere Beschreibung der Probe anbietet.

2.1.4 Vom Interferometer zur OCT

Fasst man die in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Ausführungen zusammen, wird deutlich, wie die Brücke von der niederkohärenten Interferometrie zu der bildgebenden OCT geschlagen werden kann:

Die aktuelle Position des Referenzspiegels kann direkt mit der lokalisierten Abbildung der Brechungsindexsprünge unterschiedlicher Gewebeschichten der zu untersuchenden Probe in Verbindung gebracht werden. Dabei ist die Position eines aus einer bestimmten Tiefe stammenden Lichtreflexes linear proportional zur Auslenkung des Spiegels im Referenzarm. Die Eindringtiefe ist nur durch die Absorptions- und Streueigenschaften der zu untersuchenden Probe begrenzt. Der an der Photodiode gemessene Strom ist direkt proportional zu der in einer bestimmten Tiefe zurückgestreuten Lichtintensität, so dass durch eine Graustufendarstellung der Einhüllenden des gemessenen Interferenzsignals ein Reflektivitätstiefenprofil des Gewebes (A-Scan) erstellt werden kann. Ein Tomogramm bzw. Schnittbild setzt sich aus mehreren nebeneinander liegenden A-Scans zusammen, wobei man die Probe unter dem Lichtstrahl hinwegführt bzw. den Lichtstrahl über die Probe fährt (B-Scan).

Aus den oben erörterten Kohärenzeigenschaften einer breitbandigen Lichtquelle geht hervor, dass im Gegensatz zur klassischen Mikroskopie das axiale und laterale Auflösungsvermögen voneinander entkoppelt sind. Die quadratische Abhängigkeit der Kohärenzlänge von der Zentralwellenlänge hat zur Folge, dass Lichtquellen mit längerer Zentralwellenlänge ein wesentlich breiteres Spektrum benötigen (siehe Abbildung 2.1.3),

2 Grundlagen

um eine vergleichbare Kohärenzlänge von Lichtquellen mit kürzerer Zentralwellenlänge zu erreichen.

Darüber hinaus muss beachtet werden, dass neben einer geringen axialen Auflösung auch die Eindringtiefe eine zentrale Rolle in der Untersuchung von biologischem Gewebe spielt. Rein qualitativ kann man sagen, dass Wellenlängen im Bereich um 800 nm stärker durch natürliche Farbstoffe, wie z.B. Melanin und Hämoglobin, absorbiert werden als im Bereich um 1300 nm, in welchem sich die Eindringtiefe mehr als verdoppelt (vgl. Abschnitt 2.2.1). Hier muss also ein Kompromiss bzw. ein genau definiertes Anwendungsgebiet gefunden werden.

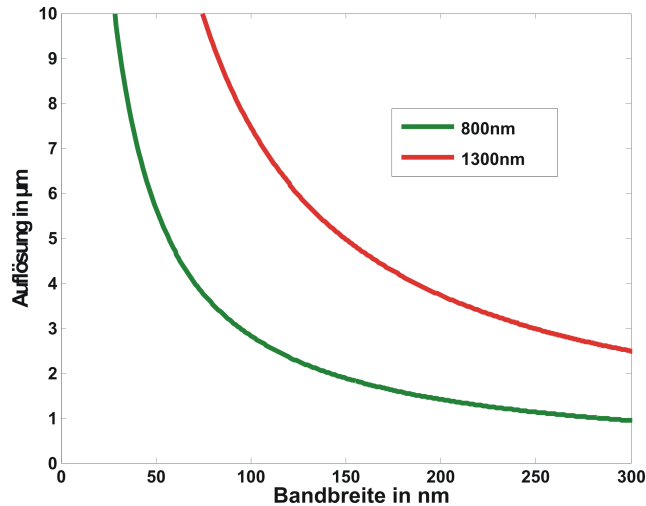


Abbildung 2.1.3: **Axiales Auflösungsvermögen aufgetragen gegen die optische Bandbreite der Lichtquelle für zwei typische in der OCT verwendete Zentralwellenlängen**

Die laterale Auflösung wird in Analogie zur Mikroskopie vom Fokusbereich Δx der Linse im Probenarm definiert und ist abhängig von der numerischen Apertur und der Zentralwellenlänge der eingesetzten Lichtquelle. Hierbei gilt für einen Lichtstrahl mit einem Durchmesser von d , einer Linse mit der Brennweite f und der numerischen Apertur $N.A.$:

$$\Delta x = \frac{4}{\pi} \frac{\lambda_C f}{d} \approx 1.27 \frac{\lambda_C}{2[N.A.]} \quad (2.1.23)$$

Definiert man ferner die Tiefe z_{max} , welche noch scharf abgebildet werden soll, als den Abstand vom Fokusbereich Δx , der kleiner ist als $\sqrt{2}\Delta x$ bzw. bei dem sich die Stirnfläche des Lichtstrahls verdoppelt, auch als zweifache Rayleigh-Länge bekannt, so ergibt sich innerhalb der gaußschen Strahlenoptik mit einem Brechungsindex n des Gewebes [7]:

$$z_{max} = 2\pi \frac{(\Delta x)^2}{\lambda_C n}. \quad (2.1.24)$$

Hier wird deutlich, dass mit steigender numerischer Apertur zwar eine höhere laterale Auflösung erreicht werden kann, doch gleichzeitig wird die Tiefenschärfe reduziert. Aus diesem Grund werden im Allgemeinen Linsen mit niedrigen Aperturen gewählt, welche einen Kompromiss zwischen Tiefenschärfe und lateraler Auflösung ermöglichen. Es ist zwar möglich eine Linse mit hoher numerischer Apertur einzusetzen und gleichzeitig eine hohe Tiefenschärfe zu erreichen, dies geht jedoch zu Lasten der Systemkomplexität, da die Linse dynamisch bei jedem A-Scan – parallel zum Referenzarmspiegel – mitgeführt werden muss.

Außerdem wird durch den direkt proportionalen Zusammenhang von lateralem Auflösungsvermögen und der Zentralwellenlänge deutlich, dass nicht nur hinsichtlich des axialen, sondern auch des lateralen Auflösungsvermögens ein Kompromiss mit der durch die wellenlängenabhängige Absorption begrenzten Bildgebungstiefe notwendig ist.

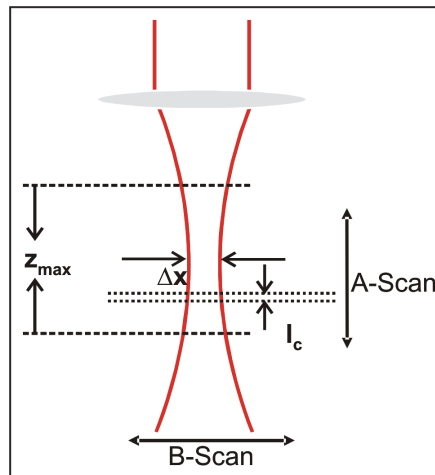


Abbildung 2.1.4: **Fokussierung im Probenarm**

In Abbildung 2.1.4 wird der oben beschriebene Zusammenhang zwischen dem axialen und lateralen Abtastvorgang bzw. Auflösungsvermögen noch einmal schematisch verdeutlicht und zusammengefasst.

2.2 SOCT

Wie schon im vorherigen Kapitel erwähnt, kann die OCT gewebespezifische Merkmale nur anhand der zurückgestreuten Lichtmenge unterscheiden; d.h., verschiedenartige Gewebestrukturen erzeugen aufgrund verschiedener Streu- und Absorptionsquerschnitte einen Kontrast und sind dadurch differenzierbar. Bezieht man spektroskopische Eigenschaften, wie z.B. die Zentralwellenlänge des lokalen Spektrums des Gewebes in die Analyse bzw. Darstellung mit ein, so kann der Kontrast weiter gesteigert werden [4]. Dies ist genau dann möglich, wenn verschiedene Gewebe- oder Materialsorten eine ähnliche Gesamtintensität des Lichtes zurückwerfen, diese jedoch auf unterschiedliche Wellenlängenbereiche verteilt ist. Diese Unterscheidung ist mit der herkömmlichen OCT nicht möglich. Das Ziel der so genannten spektroskopischen OCT (SOCT) ist eine Erhöhung des Kontrastes von einem reinen Intensitätsbezug zu einer zusätzlichen Wellenlängenabhängigkeit. Das kann dadurch erreicht werden, dass man neben der Auswertung der Einhüllenden auch die Frequenz des Interferenzsignals in die Darstellung des Tomogramms mit einbezieht.

Prinzipiell gibt es zwei Mechanismen, die den wellenlängenabhängigen Kontrast beeinflussen. Das ist auf der einen Seite die wellenlängenabhängige Absorption und auf der anderen Seite die wellenlängenabhängige Streuung.

2.2.1 Absorption

Die Absorption im Gewebe folgt im Allgemeinen dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$I(\lambda, z) = I_0(\lambda, z = 0) \exp(-\mu_a(\lambda)z), \quad (2.2.1)$$

wobei $I(\lambda, z)$ die Intensität in der Tiefe z bezogen auf die Ausgangsintensität I_0 beschreibt. Der Kehrwert des wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten μ_a kann als mittlere freie Weglänge des Photons interpretiert werden, bevor es vom Material absorbiert wird.

Im Fall von biologischem Gewebe ist die Absorption hauptsächlich bestimmt durch die Absorptionsprofile der Hauptbestandteile des zu untersuchenden Gewebes. Hier spielen im Nahinfraroten (NIR) Wellenlängenbereich, der für die OCT genutzt wird, Wasser, Melanin und Hämoglobin eine tragende Rolle. In Abbildung 2.2.1 ist diese Abhängigkeit quantitativ verdeutlicht.

Genau dieser Wellenlängenbereich ist z.B. für die Bestimmung des Sauerstoffgehalts über das Absorptionsverhalten des Hämoglobins interessant. Wie in [11] gezeigt wurde, konnten mit Hilfe der SOCT die wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten von Oxi- und Desoxihämoglobin (HbO_2 und Hb) *in vitro* unterschieden werden.

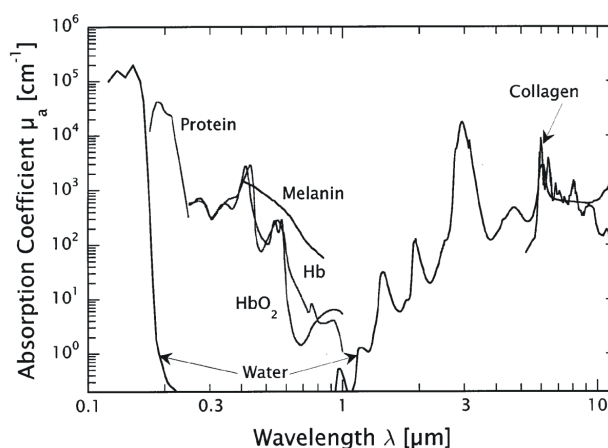


Abbildung 2.2.1: **Absorptionskoeffizient typischer Gewebeschromophore im Wellenlängenbereich von 100-12000 nm; aus [10]**

Wie man am Beer'schen Gesetz sehen kann, ist entweder eine hohe Konzentration des Absorbers oder eine lange durch den Absorber führende Strecke notwendig, um eine signifikante Verschiebung des Spektrums für Gewebe mit ähnlichen Absorptionsverhalten zu erreichen. Aus diesem Grund kann man, wie z.B. in der Histologie und Mikroskopie üblich, das Absorptionsverhalten des Gewebes mit Hilfe von Farbstoffen beeinflussen und den Kontrast steigern, indem man diesen Farbstoff gewebespezifisch in die Probe einbringt und dessen Absorptionsverhalten lokalisiert detektiert. Hierzu sind erste Schritte in Richtung spektroskopischer Kontraststeigerung an einfachen Gewebemodellen und pflanzlichen Präparaten gemacht worden [12]. Zudem wurde gezeigt, dass mit entsprechendem Aufwand Absorptionskoeffizienten von unterschiedlich stark angefärbten Geweben mit einem Fehler im einstelligen Prozentbereich orts aufgelöst bestimmt werden können [13]. Diese Präzision ist zur Zeit jedoch nur in leicht streuenden Geweben und in einem Wellenlängenbereich erreichbar, der in etwa dem FWHM des Spektrums entspricht. Trotz dieser vielversprechenden Ansätze muss erwähnt werden, dass diese Technik von der Unterdrückung einzelner Frequenzbänder lebt, was zu einem zu starken Intensitätsverlust in den tieferen Gewebeschichten führen kann, wenn mit zu hohen Konzentrationen des Farbstoffs gearbeitet wird. Hier bietet die Kontraststeigerung über die Streuung des Gewebes eine Alternative, da der Effekt der Streuung nahezu punktuell ist.

2.2.2 Streuung

Die Entstehung des spektroskopischen Kontrastes durch Streuung basiert nicht wie in der Absorption auf der Ausblendung einiger Teile der Spektrums, sondern beruht auf der Tatsache, dass die Streupartikel des Gewebes je nach Größe, Brechungsindex und räumlicher Verteilung bei der Rückstreuung des Lichtes eine charakteristische Modulation des Spektrums hervorrufen.

Ausgangsbasis ist die Beschreibung von biologischem Gewebe mit Hilfe der Streutheorie nach Mie. Die Zelle, d.h. der Zellkern und die darumliegenden Zellorganellen können hierfür als sphärische Streuzentren approximiert werden, deren optisches Verhalten durch die Mie-Theorie beschrieben werden kann [7]. Wie in verschiedenen Studien (z.B. [14, 15]) gezeigt wurde, ist diese Näherung ausreichend, um experimentelle Aussagen über Größe und Brechungsindex der Streuzentren zu treffen. Sowohl durch Simulationen [16] als auch im Experiment [17] ist demonstriert worden, dass die Modulation des Spektrums im Falle der Einteilchenstreuung direkt proportional zur Teilchengröße und -dichte ist. Auch wenn mehrere kugelförmige Teilchen mit unterschiedlicher Größe, Brechungsindex und Dichte gleichzeitig beleuchtet werden, interferieren die Felder in einem stochastischen Prozess kohärent und hinterlassen eine Modulation. Dies ist ein zur intensitätsbasierten OCT analoger Prozess, bei dem verschiedenartige streuende Teilchen innerhalb des beleuchteten Volumens ein kohärentes Interferenzmuster zurückwerfen, das man als Speckle bezeichnet [18] und das sich im Bild als Rauschen bemerkbar macht. In der SOCT ist dieses Muster sowohl in der Intensität des zurückgestreuten Lichtes als auch in der Modulation des lokalen Spektrums vorhanden. Diese spektrale Modulation kann also auf einen Prozess zurückgeführt werden, dessen Eigenschaften durch die Größe, Dichte und den Brechungsindex der Zellorganellen im beleuchteten Volumen bestimmt werden. Damit wird eine Unterscheidung verschiedener Zell- und damit auch Gewebetypen mit Hilfe der Spektrumsmodulation als Maß für spektroskopischen Kontrast in Aussicht gestellt. Insbesondere im Hinblick auf Krankheiten, welche die Zellgröße und -dichte des Gewebes beeinflussen (wie z.B. Krebs [19]), könnte eine Kontraststeigerung durch die Analyse des Rückstreuerverhaltens den entscheidenden Beitrag liefern.

Die oben aufgeführten Untersuchungen haben allerdings auch gezeigt, dass die durch die Streuung verursachten Modulationen nicht immer einen eindeutigen Rückschluss auf die Teilchengrößen zulassen, da die Modulationen auch von anderen Variablen, wie z.B. dem Durchmesser des beleuchteten Volumens, der räumlichen Verteilung der Teilchen, der Brechungsindexvariationen oder aber der Mehrfachstreuung abhängig sind. Hinzu kommt außerdem, dass die Mie-Theorie weitaus komplexer ist als das Lambert-Beer'sche Gesetz, was die Interpretation der Modulation in einem inhomogenen Medium schwierig macht. Nichtsdestotrotz hat sich folgender mathematischer Ansatz zur Beschreibung der Streu- und Absorptionseigenschaften einer biologischen Probe als zufriedenstellend herausgestellt:

Die Fouriertransformation der Amplitudenrückstreuungsfunktion $H(f, L)$ enthält neben den Interferometereigenschaften auch das Absorption- und Streuverhalten der Probe. Nimmt man an, dass nur die Einfachstreuung zum Interferenzsignal beiträgt und dass der Realteil des Brechungsindex von der Oberfläche der Probe $z = 0$ bis zur Tiefe $z = L = c\tau$ nicht stark variiert, so gilt:

$$H(f, L) \sim \sqrt{\mu_R(f, L)} \exp\left[-2 \int_0^L dz \mu_A(f, z) + \mu_S(f, z)\right]. \quad (2.2.2)$$

Dabei beschreibt $\mu_A(f, z)$ den Absorptionskoeffizienten und $\mu_S(f, z)$ den Streukoeffizienten in der Tiefe z , während $\mu_R(f, L)$ der Rückstreckoeffizienten wiedergibt. Sind die Intensitätsverluste durch Streuung, sprich durch $\mu_S(f, z)$, vernachlässigbar und ist die zu untersuchende Probe sehr homogen, so geht aus Gleichung 2.2.2 und 2.1.20 das Lambert-Beer'sche Gesetz hervor.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in zahlreichen Studien gezeigt worden ist, dass eine Kontraststeigerung in der spektroskopischen Domäne nicht nur möglich ist, sondern auch vielversprechende Perspektiven eröffnet. Während die Betrachtung der Absorption für eine Kontraststeigerung relativ hohe optische Weglängen benötigt, ist eine Kontraststeigerung durch eine Quantifizierung der Streuung sehr lokalisiert möglich. Die Absorption zeichnet sich indes durch eine einfache mathematische Beschreibung aus, während die Streuung mathematisch nicht eindeutig zu erfassen ist. Des Weiteren muss beachtet werden, dass beide Mechanismen zusammen im Gewebe auftreten. Erste Schritte zu ihrer Separierung sind bereits beschrieben worden [20].

In dieser Diplomarbeit werden neben dem Aufbau und der Charakterisierung eines SOCT-Systems beide oben vorgestellten Mechanismen auf ihr Potential zur Steigerung des spektroskopischen Kontrastes anhand eines definierten biologischen Modellsystems untersucht.

3 Aufbau

Zuerst wird eine Übersicht über den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau gegeben, worin der Signalverlauf im Freistrahlint interferometer von der Lichtquelle bis zur bildgebenden Datenerfassung beschrieben wird. Zudem werden die für die OCT bzw. SOCT wichtigen optischen, elektronischen und optomechanischen Komponenten näher beschrieben.

3.1 Übersicht

Das in Abbildung 3.1.1 dargestellte Interferometer ist eine Erweiterung des klassischen Michelson-Interferometers, welches im vorherigen Kapitel ausführlich beschrieben wurde.

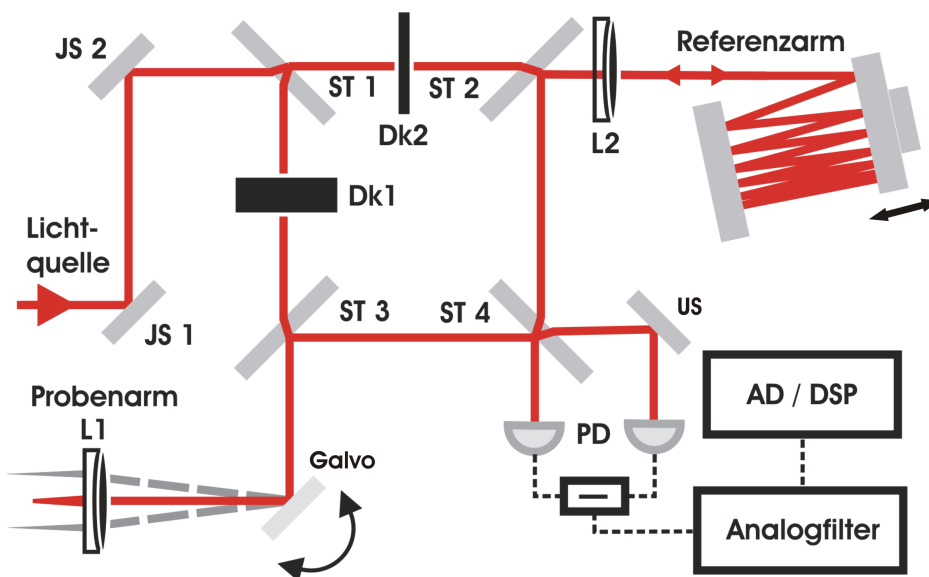


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung des Freistrahlint interferometers

Das Licht des verwendeten Ti:Saphir-Lasers wird mit Hilfe einer Monomode-Faser in den Freistrahlaufbau eingekoppelt und trifft auf zwei Justagespiegel *JS*, mit denen nur die Höhe und der seitliche Versatz des Strahls beeinflusst wird. Der Strahlteiler *ST1* teilt den Lichtstrahl in Proben- und Referenzstrahl auf.

Der durch *ST1* in den Probenarm reflektierte Teilstrahl durchläuft die Dispersionkompensation *Dk1* und wird mit Hilfe des Strahlteilers *ST3* auf den Galvanometerspiegel reflektiert. Dieser kann, durch eine Spannung angetrieben, den Lichtstrahl über die Probe führen, wobei der Lichtstrahl, bevor er auf die Probe trifft, durch die Linse *L1* fokussiert

wird. Der durch $ST1$ transmittierte Teilstrahl durchläuft die Dispersionskompensation $Dk2$ und den Strahlteiler $ST2$ und wird über die Linse $L2$ auf den Referenzspiegel fokussiert. Dabei wird der Referenzstrahl zwischen den beiden keilförmig zueinander angeordneten Referenzspiegeln hin und her reflektiert, so dass der letzte Lichtreflex genau im 90° -Winkel auf einen der Spiegel trifft. Die von der Probe bzw. dem Referenzspiegel zurückgestreuten Teilstrahlen werden von $ST3$ bzw. $ST2$ auf die Photodiode PD gelenkt, wo sie mit Hilfe von $ST4$ wieder überlagert und mit den Doppeldioden PD detektiert werden.

Nach elektronischer Subtraktion beider um π verschobener Teilsignale erfolgt die elektronische Verstärkung und eine auf die Bandbreite der Lichtquelle abgestimmte Filterung durch einen Bandpass. Anschließend wird das resultierende Signal digitalisiert, demoduliert und nachverarbeitet.

3.2 Optik

Zu den wesentlichen optischen Komponenten gehören die Lichtquelle, die mit ihrem Spektrum das axiale Auflösungsvermögen bestimmt, die Strahlteiler, welche die einzusetzende Bandbreite und Zentralwellenlänge begrenzen, und die Linsen, die neben der Probe das Dispersionsverhalten des Interferometers in erster Linie beeinflussen. Auf das durch die Probenarmlinse bestimmte transversale Auflösungsvermögen wird erst in Abschnitt 3.4.1 eingegangen.

3.2.1 Lichtquelle

Ausgehend von dem Ti:Saphir-Ringoszillator *GigaJet 20* der *GigaOptics GmbH*, der mit einem frequenzverdoppelten $Nd : YVO_4$ -Laser gepumpt wird, wurde die ursprüngliche Bandbreite (20 nm) dieses kerrlinsen-modengekoppelten Lasers durch Dispersionsmanagement innerhalb des Oszillators auf 80 nm verbreitert. Bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm kann diese Bandbreite unter Annahme einer gaußförmigen Leistungsverteilung eine Kohärenzlänge und somit ein axiales Auflösungsvermögen von $3,52 \mu\text{m}$ in Luft erzielen.

Ferner zeichnet sich diese Lichtquelle durch eine hohe Ausgangsleistung von 400 mW aus. Im Vergleich dazu erreichen die in kommerziellen OCT-Systemen eingesetzten SLD's und LED's nur einige wenige Mikro- bis Milliwatt [2], was zur Folge hat, dass die maximal zu erreichende Eindringtiefe, beschränkt durch Absorption und Streuung im Gewebe (vgl. Abschnitt 2.2.1), reduziert wird. Durch die vergleichsweise hohe Leistung des Ti:Saphir-Lasers kann also nicht nur die Eindringtiefe gesteigert werden, sondern insbesondere Leistungsverluste vernachlässigt werden, die hauptsächlich auf die Glasfaser und Mehrfachreflexionen innerhalb der Linsen und Strahlteiler zurückzuführen sind.

3.2.2 Freistrahlaufbau und Strahlteiler

Der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Freistrahlaufbau des OCT-Interferometers besitzt gegenüber den in kommerziellen Systemen eingesetzten, faserbasierten Systemen einige Vorteile. Im Hinblick auf den Einsatz von Lichtquellen, die noch breitbandiger sind als der hier eingesetzte Ti:Saphir-Laser, kommt ein faserbasiertes Interferometer nicht in Frage, da es zur Zeit keine kommerziellen Faserkoppler gibt, die Bandbreiten von mehr als 120 nm unterstützen.

Die am IHT hergestellten Strahlteiler können nicht nur ein nahezu konstantes Teilungsverhältnis in einer Bandbreite von bis zu 150 nm aufweisen, sie können diese Konstanz sogar über einen großen Wellenlängenbereich von etwa 800 nm bis 1300 nm gewährleisten. Sie besitzen im Durchschnitt einen Leistungsverlust durch Absorption von nur 10%. Die gemessene, wellenlängenabhängige Reflektivität eines für 800 nm ausgelegten symmetrischen Strahlteilers fällt bis 1300 nm linear auf 36% ab. Dies ermöglicht ohne weiteren Umbau den Einsatz von Lichtquellen bei verschiedenen Zentralwellenlängen.

Einer der Gründe für den Einsatz von vier anstatt einem Strahlteiler im OCT-Interferometer ist die Tatsache, dass die Strahlteiler mit einer durchschnittlichen Abweichung von weniger als 3% in jedem beliebigen Teilungsverhältnis hergestellt werden können. Durch die Herstellung des stark asymmetrischen Teilers *ST1* (98:2) ist es möglich, dem Verlust der auf die Probe fokussierten Lichtleistung durch Absorption, Mehrfachstreuung und Streuung in nicht erfasste Raumwinkel in der Probe entgegenzuwirken, indem der größte Teil der Lichtleistung (98%) in den Probenarm reflektiert wird. Um diesen Effekt zu unterstützen wurde auch *ST3* mit einem asymmetrischen Teilungsverhältnis (88:12) ausgestattet, so dass das von der Probe zurückgestreute Licht verstärkt in Richtung Diode gelenkt wird. Diese Technik zur Erhöhung der Photonenausbeute im Probenarm wird in einem faserbasierten System normalerweise durch einen optischen Rotator erreicht und trägt zu einer Steigerung der Empfindlichkeit bei [21]. Die Strahlteiler *ST2* und *ST4* weisen ein nahezu symmetrisches Teilungsverhältnis (53:47 und 52:48) auf. Die reflexionsbedingten Leistungsverluste sind zu vernachlässigen, da genug Laserleistung zur Verfügung steht und für die OCT aufgrund der hohen Empfindlichkeit eine Leistung von wenigen mW auf der Probe ausreichend ist.

3.2.3 Linsen und Dispersionskompensation

Dispersionskompensation spielt in der OCT eine entscheidende Rolle, da unterschiedliche Dispersion in den Interferometerarmen das axiale Auflösungsvermögen reduziert. Da das Interferometer die Autokorrelation bzw. Kreuzkorrelation der aufgeteilten Signale misst, spielt nur die relative Dispersion zwischen Proben- und Referenzarm eine Rolle. Im Interferometer gibt es zwei unabhängige Ursachen von Dispersion, welche sich als zusätzliche frequenzabhängige Phase Φ_D im Probenstrahl bemerkbar machen, wenn in einem dispersiven Medium die Strecke z durchlaufen wird [22]:

$$\Phi_D(f) = k^{(0)}(f_0)z + k^{(1)}(f_0)(f - f_0)z + k^{(2)}(f_0)\frac{(f - f_0)^2}{2}z + \dots, \quad (3.2.1)$$

wobei $k^{(i)}(f_0) = \left(\frac{d^i k}{d f^i}\right)_{(f=f_0)}$ die Dispersion i -ter Ordnung bezeichnet.

Die Dispersion nullter Ordnung bewirkt eine konstante zeitliche Verschiebung des Kohärenzsignals; d.h. es wird ein Phasensprung beobachtet. In erster Ordnung muss der Laserpuls einen um den Gruppenindex n_G längeren Weg zurücklegen, so dass sich das Auflösungsvermögen l_{CD} im Medium um den gleichen Faktor verbessert. Geht man von $l_{CD} = 3,52 \mu\text{m}$ aus, so erhöht sich das Auflösungsvermögen nach folgender Gleichung im Durchschnitt auf $2,65 \mu\text{m}$ im Gewebe:

$$l_{CD} = \frac{l_C}{n_G}. \quad (3.2.2)$$

Erst die Terme zweiter und höherer Ordnung beschreiben die wellenlängenabhängige Dispersion eines Lichtpulses. Hier ist darauf zu achten, dass sich der Puls, beschrieben in der SVE-Näherung, mit der Gruppengeschwindigkeit $v_G = \frac{1}{k^{(1)}}$ durch das Medium bewegt und die einzelnen Frequenzanteile des Pulses unterschiedliche Geschwindigkeiten besitzen, was zu einer Verzerrung des Interferenzterms im Zeit- und Frequenzraum führt. Dies geht mit einer Erhöhung der Kohärenzlänge bzw. einer Reduktion des Auflösungsvermögens einher [23]. Streng genommen geht die symmetrische Autokorrelation in eine asymmetrische Kreuzkorrelation mit unterschiedlichen Flanken über (vgl. Abbildung 3.2.3). Die Autokorrelation erhält einen Chirp.

Die erste Ursache von Dispersion ist die Probe selbst. Die Dispersion erster Ordnung kann mit Hilfe eines Korrekturfaktors (der durchschnittliche Brechungsindex im Gewebe beträgt etwa 1,33) berücksichtigt werden. Der Verlust des Auflösungsvermögens durch höhere Ordnungen kann durch Dispersionskompensation innerhalb der Interferometerarme nur für eine bestimmte Probentiefe optimiert werden. Außerhalb dieser Ebene muss ein Verlust des Auflösungsvermögens in Kauf genommen werden, da dieser Effekt gewebespezifisch ist.

Man kann den Verlust des Auflösungsvermögens auf ein Minimum reduzieren, indem man den Ort, an dem die Dispersion ausgeglichen ist, in die Probe (am besten auf die Hälfte der maximalen Eindringtiefe oder auf $z_{max}/2$), verschiebt. Dies kann durch Einsatz einer zusätzlichen Dispersionskomponente in das Interferometer ($Dk1$ oder $Dk2$) erreicht werden, wobei dies nur sinnvoll ist, wenn die Streu- und Absorptionseigenschaften des zu untersuchenden Gewebes nicht zu stark variieren. Darüber hinaus behandelt [24] die Möglichkeit einer digitalen Dispersionskompensation. Aufgrund des hohen Aufwands und der Tatsache, dass der Fehler durch Dispersion im Hinblick auf die SOCT nur wenige Prozent beträgt [13], wurde in dieser Arbeit auf eine Dispersionskompensation in der digitalen Nachverarbeitung verzichtet.

Eine weitere Ursache von unterschiedlicher Dispersion in den Interferometerarmen ist die unterschiedliche Dicke der im Interferometer eingesetzten Linsen $L1$ und $L2$. Diese kann durch den Einsatz eines Glasstückes in den Referenzarm, bestehend aus den in den Linsen verwendeten Glassorten, kompensiert werden. Die Strahlteiler sollten in erster Näherung nicht zu einer asymmetrischen Dispersion in den Interferometerarmen beitragen, da die optischen Weglängen in den Interferometerarmen aufgrund der Symmetrie

des Interferometers gleich sind.

Um den chromatischen Linsenfehler für die eingesetzte Bandbreite zu minimieren, wurden in beiden Armen NIR-Achromaten mit zwei unterschiedlichen Glassorten (LaKN22 und SFL6) verwendet. Da sich die Distanzen, auf die der Laserstrahl im Referenz- bzw. Probenarm fokussiert werden muss, um eine Größenordnung voneinander unterscheiden, weicht die Dicke der Linsen ($f_1 = 35 \text{ mm}$ und $f_2 = 200 \text{ mm}$) voneinander ab. Damit erfährt der Referenzstrahl wegen der dickeren Linse im Referenzarm eine größere Dispersion als der Probenstrahl. Die Dicke der einzusetzenden Kompensation entspricht der zweifachen Differenz der Dicken der verschiedenen Glassorten aus $L1$ und $L2$, da die Linsen jeweils zwei Mal vom Strahl durchlaufen werden. In erster Näherung ergibt sich durch die vom Linsenhersteller (*Edmund Optics GmbH*) angegebene Glasdicken eine Differenz von $1,5 \text{ mm}$ für beide Glassorten. Es ist allerdings zu beachten, dass die durch den Hersteller der Linsen und der Strahlteilerglassubstrate angegebene Toleranz für jeweils eine Linse bzw. ein Substrat $0,2 \text{ mm}$ beträgt. Obwohl mit Hilfe der am Institut vorhandenen Poliermaschine Glassubstrate mit einer gewünschten Schichtdicke bis auf etwa $10 \mu\text{m}$ genau hergestellt werden können, ergibt sich in der Herstellung des Dispersionausgleichs trotzdem eine Ungenauigkeit von mehreren hundert Mikrometern.

Aus diesem Grund wurden in einem ersten Schritt zwei Glassubstrate (LaKN22 und SFL6) mit einer Dicke von etwa 3 mm angefertigt und in den Probenarm positioniert ($Dk1$). Im nächsten Schritt wurde dann ein Silberspiegel in den Probenarm gelegt, um die Autokorrelation zu messen, welche als blauer Graph in Abbildung 3.2.1 wiedergegeben ist. Zur Optimierung der Dispersion wurden Deckgläser mit einer durchschnittlichen Dicke von $180 \mu\text{m}$ in den Referenzarm zwischen $ST2$ und $L2$ platziert, so dass der Lichtstrahl diese zwei Mal durchläuft. Anhand der durch die unterschiedlich geschirpten Pulse verursachten Verzerrungen der Auto- bzw. Kreuzkorrelation kann bestimmt werden, ob und in etwa wieviel Material zugegeben oder abgenommen werden muss, um die Dispersion zu optimieren.

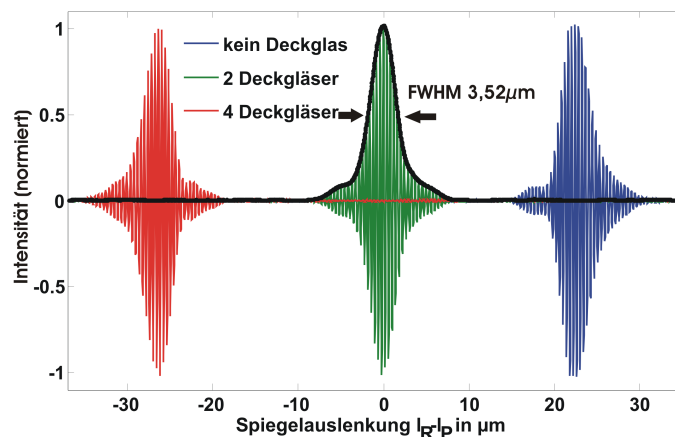


Abbildung 3.2.1: Feinjustage der Dispersionskompensation durch Messung des Chirp der Autokorrelation mit Hilfe von in den Referenzarm eingesetzten Deckgläsern

Die Beobachtungen zu diesem Versuch sind in Abbildung 3.2.1 zusammenfassend illustriert. Die Autokorrelationen für eine unterschiedliche Anzahl an Deckgläsern als zusätzliche dispersive Komponente im Referenzarm sind als Funktion der Spiegelauslenkung in dieser Abbildung nebeneinander dargestellt. Hierzu ist der Nullpunkt willkürlich in die Mitte des Graphen gesetzt worden. Es ist an dem Wechsel des Chirp von der rechten Flanke (roter Graph) zur linken Flanke (blauer Graph) der Autokorrelation zu erkennen, dass mit dem Einsatz von zwei Deckgläsern die Dispersion nahezu komplett kompensiert werden kann (grüner Graph). Dies bedeutet, dass die Dispersion im Referenzarm ohne Glasplatten geringer ist als im Probenarm. Möchte man nun den Ort, an dem die Dispersion ausgeglichen ist, in die Probe verlegen, ergibt sich die Länge der zusätzlichen Kompensation aus folgenden Annahmen:

Geht man in erster Näherung davon aus, dass die Dispersion nur durch die optische Weglänge bestimmt wird, so kann man die von dem Lichtstrahl zurückgelegte optische Weglänge im Gewebe mit der zurückgelegten optischen Weglänge in dem einzusetzenden Glas über den Brechungsindex vergleichen. Um die Leistungsverluste durch Reflexion an der Kompensation zu minimieren, wird diese nicht zwischen $ST2$ und $L2$ gelegt, sondern an die Stelle $Dk2$, was allerdings mit einem Faktor zwei in der Weglänge berücksichtigt werden muss. Es ergibt sich also für die Länge l_{Dk1} der Kompensation $Dk1$ mit dem Brechungsindex 1,53 und für eine maximalen Eindringtiefe von 1 mm in Gewebe mit einem mittleren Brechungsindex von 1,33:

$$l_{Dk1} = \frac{2 \times 1,53 \times 2 \times 180 \mu m + 2 \times 1,33 \times 500 \mu m}{1,53} = 1590 \mu m. \quad (3.2.3)$$

Die Halbwertsbreite der demodulierten Einhüllenden der dispersionskompensierten Autokorrelation bestimmt das zur Verfügung stehende axiale Auflösungsvermögen. Dieses wurde experimentell zu $3,52 \mu m$ in Luft bestimmt. Dieser Wert stimmt mit dem aus der berechneten Bandbreite überein, womit eine ideale Dispersionskompensation angenommen werden kann und die Betrachtung des Laserspektrums über ein Gaußprofil gerechtfertigt ist. Das Auflösungsvermögen des Systems in biologischem Gewebe beträgt damit unter Berücksichtigung eines Brechungsindex von $n = 1,33$ ca. $2,6 \mu m$.

3.3 Elektronik

Zu der in diesem SOCT-System verwendeten Elektronik gehören sowohl die Photodioden mit nachgeschaltetem Stromverstärker als auch ein analoger Bandpass und das Datenerfassungssystem sowie die Ansteuerplatine, welche die Verzögerungsstrecke des Referenzarms zusammen mit dem Galvanometer ansteuert und mit der Datenerfassung synchronisiert.

3.3.1 Photodiode

Das Interferogramm wird mit Hilfe des *Balanced Photo-Receiver-Head AM-S* der Firma *FEMTO* aufgezeichnet. Dieses sogenannte „Balanced-Detection“-Schema dient der Verbesserung der Empfindlichkeit des SOCT-Systems und ist ein weiterer Grund für den Einsatz von vier anstatt nur einem Strahlteiler. Angesichts der Tatsache, dass das elektrische Feld im Idealfall bei jeder Reflexion an einem Spiegel bzw. Strahlteiler einen Phasensprung von π erhält, ruft die in diesem Aufbau verwendete Spiegel- bzw. Strahlteileranordnung eine 90° -Phasenverschiebung zwischen dem durch den Strahlteiler *ST4* transmittierten und reflektierten Strahl aus dem Referenz- bzw. Probenarm hervor. Die daraus resultierenden OCT-Signale, welche von den zwei Dioden detektiert werden, sind deshalb um 180° phasenverschoben, so dass bei der Subtraktion der Signale das inkohärente Rauschen des Lasers unterdrückt wird, während der kohärente Anteil verdoppelt wird. Für den idealen Fall, dass der Umlenkspiegel *US* perfekt reflektiert und dass der Strahlteiler *ST4* ein absolut symmetrisches Teilungsverhältnis besitzt, ist das Rauschen des gemessenen Interferenzterms nur durch das Rauschen der Elektronik begrenzt [21]. Dieses wird anschließend mit Hilfe eines analogen Bandpassfilters reduziert und im Idealfall lediglich durch das Schrotrauschen (engl. shot noise) dominiert.

Bei dem Doppeldiodenkopf handelt es sich um zwei Silizium-PIN Photodioden (Empfindlichkeit: 0.6 A/W bei 900 nm), die den durch das Signal erzeugten Photostrom differentiell an den Verstärker *DHPCA-S (FEMTO)* mit einer Bandbreite von bis zu 200 MHz weiterleiten. Dadurch werden hohe Verstärkungsfaktoren von bis zu 10^8 V/A bzw. 1000 V/A für die höchste Bandbreite erreicht. Im Übrigen wurde auch ein dazu passender und zur Si-Photodiode baugleicher InGaAs-Diodenkopf angeschafft, so dass höhere Zentralwellenlängen für die SOCT detektierbar sind.

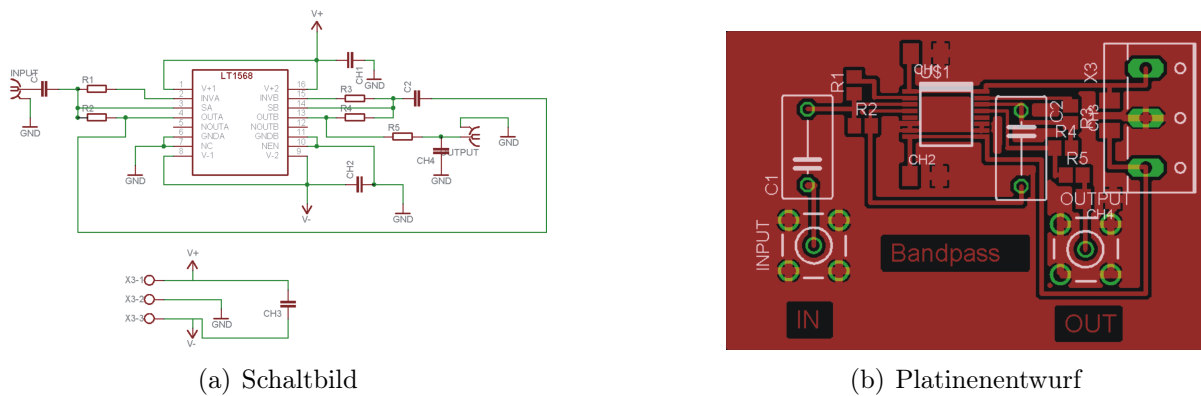
3.3.2 Analoge Filter

Die in kommerziellen OCT-Systemen verwendeten Filter sind in der Regel aus diskreten Bauelementen, Widerständen, Kondensatoren und Operationsverstärkern zusammengesetzt. In dem hier verwendeten Aufbau wurde der integrierte Baustein *LTC-1568* der Firma *Linear Technologies* eingesetzt, welcher in Kombination mit einigen wenigen Widerständen und Kondensatoren einen vierpoligen Bandpassfilter mit linearem Phasengang realisiert. Ein Schaltbild und der Platinenentwurf sind in Abbildung 3.3.1 wiedergegeben.

Durch die Wahl der Widerstände und Kapazitäten lässt sich nicht nur die Mittenfrequenz von 100 kHz bis 10 MHz , sondern auch die Bandbreite (-3 dB) bis auf 10% der Mittenfrequenz mit hoher Präzision einstellen. Die Mittenfrequenz wird, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, durch die Doppler- bzw. Trägerfrequenz f_T bestimmt, während die elektronische Bandbreite Δf_T abhängig ist von f_T , der Zentralwellenlänge λ_C und der optischen Bandbreite (FWHM) $\Delta\lambda$:

$$f_T = 2 \frac{v}{\lambda_C} \quad ; \quad \Delta f_T = \frac{\Delta\lambda}{\lambda_C} f_T. \quad (3.3.1)$$

Nimmt man bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm eine Bandbreite von 80 nm



(a) Schaltbild

(b) Platinenentwurf

Abbildung 3.3.1: Aktiver vierpoliger Bandpass

an, so ergibt sich eine benötigte elektronische Bandbreite von 10% der Mittenfrequenz. Durch die hohe Flankensteilheit des Bandpasses bzw. aufgrund der Asymmetrie der Frequenzantwort des Filters und der Abweichung des Laserspektrums von der Gaußsymmetrie kommt es allerdings zu einem Abschneiden des Spektrums in den Randbereichen (vgl. später Abschnitt 5.1). Um diesen Effekt, etwaige Nichtlinearitäten der Modulationsgeschwindigkeit und Variationen des Laserspektrums im täglichen Betrieb zu berücksichtigen, wurde die Bandbreite des Bandpasses auf 15% der Mittenfrequenz erweitert, ohne dass eine signifikante Erhöhung des Rauschens zu beobachten war.

3.3.3 Datenerfassung

Die Aufnahme des Interferenzsignals erfolgt durch das von der *AMO GmbH* erworbene *Saturn-System*. Dies ist ein modulares Messsystem zum Aufzeichnen und Anzeigen von elektrischen Spannungen. Die Abtastung kann mit einer maximalen Abtastrate von 100 MHz erfolgen, wenn nur einer der vier auf einem A/D-Wandlermodul zu Verfügung stehenden Kanäle zur Datenerfassung genutzt wird. Diese Rate reduziert sich auf ein Viertel der maximalen Rate, wenn mit mehreren Kanälen gemessen wird. Neben der für eine hohe Messgeschwindigkeit benötigten Abtastrate ist das *Saturn-System* für das Aufnehmen und Darstellen großer Datenmengen (32 Millionen Punkte pro Kanal bzw. 128 Millionen Punkte für Messungen mit einem Kanal) ausgelegt. Außerdem nutzt das System bei Abtastraten unterhalb von 25 MHz die Überabtastung (engl. oversampling), so dass die normale Auflösung von 12 Bit auf bis zu 20 Bit gesteigert werden kann, wodurch das Mess- und Systemrauschen reduziert wird.

Die digitale, bildgebende Nachverarbeitung erfolgt mit einem handelsüblichen *AMD Athlon64 X2 Dualcore Prozessor (4200+)*, der mit 2 GB RAM ausgestattet ist und mit einer Taktfrequenz von 2,2 GHz arbeitet. Zur Auswertung der Daten wird sowohl mit *LabView* als auch mit *MatLab* gearbeitet. Aufgrund der hohen zu verarbeitenden Datenmengen sind hierzu hohe Rechenzeiten notwendig.

3.3.4 Messung der Empfindlichkeit

Werden alle oben genannten Maßnahmen zur Reduktion des Rauschens angewandt und das „Signal-to- Noise-Ratio“ (SNR – dt. Signal zu Rausch Verhältnis) des in dieser Arbeit aufgebauten und verwendeten OCT-Systems gemessen, so erhält man einen Wert von 104 dB für die Empfindlichkeit des Systems. Die Empfindlichkeit ist definiert als die negative Dämpfung des Signals bei einem SNR von Eins, d.h. wenn das Interferenzsignal gerade im Rauschen untergegangen ist.

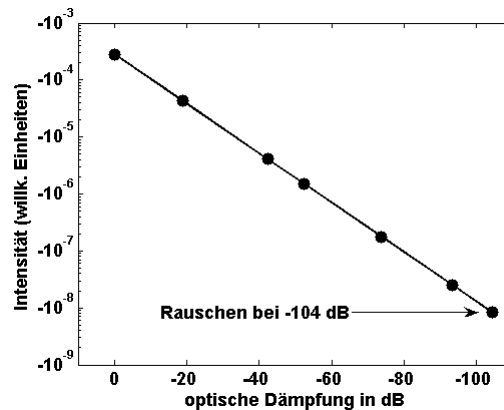


Abbildung 3.3.2: Messung der Empfindlichkeit des OCT-Systems durch den Einsatz von Neutralfilter in den Probenarm

In Abbildung 3.3.2 ist das Ergebnis der Messung ersichtlich. Hierfür wurde zunächst die Amplitude der Autokorrelation mit Hilfe eines Silberspiegels als Probe gemessen. Um das Vorhandensein einer biologischen Probe nachzuahmen, wurden nach und nach Neutralfilter mit einem definierten Abschwächungsfaktor in den Probenarm eingeführt. Die daraus resultierenden Signalintensitäten sind in dem Graphen als Funktion der optischen Dämpfung logarithmisch aufgetragen. Es wurden solange Filter in den Probenarm gestellt, bis die Autokorrelation nahezu im Rauschen des Signals verschwunden war. Der letzte Messwert, die Empfindlichkeit, wurde daraufhin aus dem mittleren Rauschpegel bestimmt.

3.3.5 Ansteuerplatine

Zur Ansteuerung der Verzögerungsstrecke und des Galvanometers in Referenz- und Probenarm und zur Synchronisierung mit der Datenerfassung wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Allgemeine Elektrotechnik und Datenverarbeitungssysteme (EECS) der RWTH Aachen eine Ansteuerplatine entwickelt. Diese Platine besteht im Wesentlichen aus einem modifizierten Standard-Computernetzteil, einer am EECS entwickelten FPGA-Platine inklusive serieller Schnittstelle (RS-232), einem *Cyclone FPGA* der Firma *Altera* und einem Board für die benötigten 12-Bit-D/A-Wandler.

Die Programmierung des FPGAs erfolgte von Mitarbeitern des EECS. Am IHT wurden in dieser Arbeit Schritt für Schritt die für die Ansteuerung und Synchronisation des SOCT-Systems zentralen Funktionen herausgearbeitet. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden diese Funktionen auf dem FPGA implementiert. Mit Hilfe einer hierfür entwickelten LabView-basierten Oberfläche (siehe Abbildung 3.3.3) können sie über die serielle Schnittstelle aufgerufen und manipuliert werden. Die Ansteuerplatine besitzt in der verwendeten Version vier 12-Bit-D/A-Wandler, welche folgende Funktionen ausüben:

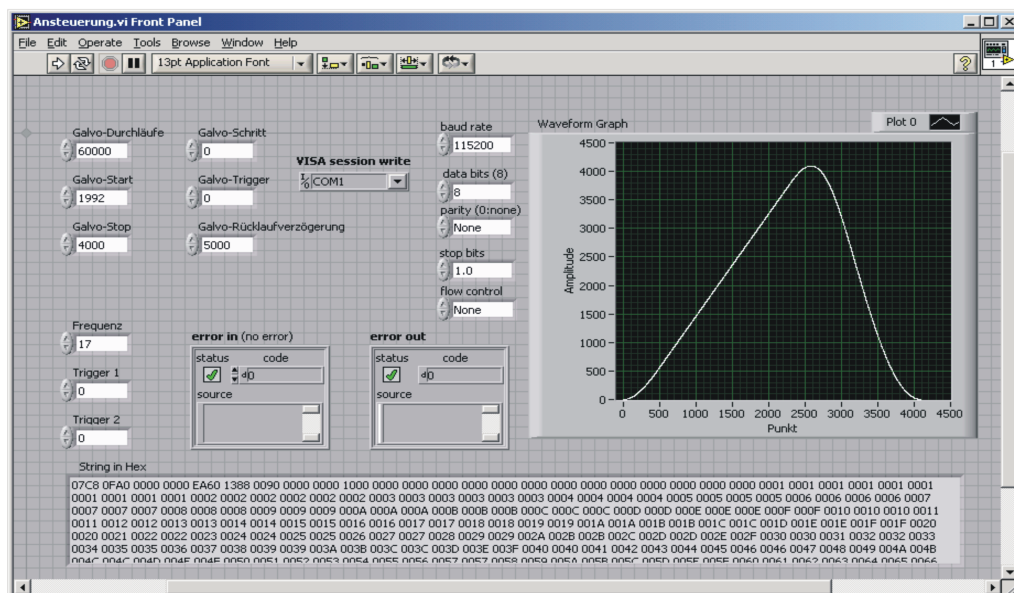


Abbildung 3.3.3: LabView-basierte Oberfläche zur Übergabe der Ansteuer- und Synchronisationsparameter über die serielle Schnittstelle

Der erste Ausgang der Ansteuerplatine ist für die Ansteuerung der Verzögerungsstrecke und somit für den A-Scan ausgelegt (vgl. Abschnitt 3.4.6). Hierbei handelt es sich um einen Piezoaktuator, der mit Hilfe eines Spannungsverstärkers betrieben wird und den Referenzspiegel in Abhängigkeit der angelegten Steuerspannung auslenkt. Der Hub des Piezoaktors bzw. die Auslenkung des Spiegels ist in erster Näherung proportional zur Spannung. Mit Hilfe des geschriebenen Programmes kann eine Ansteuerkurve mit bis zu 4096 Werten in den Speicher des FPGAs geladen werden, welche dann in einer 12-Bit quantisierten Spannungskurve ausgegeben wird. Diese Spannung wird dann von einem Differenzverstärker an den für den Spannungsverstärker benötigten Pegel angepasst und mit einem analogen Tiefpass gefiltert. Der Verlauf der übergebenen Ansteuerkurve kann in dem Fenster der Software betrachtet werden. Für einen A-Scan ist eine möglichst gleichmäßige und lineare Auslenkung des Spiegels und eine möglichst schnelle Relaxation in die Ausgangsposition notwendig. Dies wird durch die Asymmetrie der Ansteuerkurve (vgl. Abbildung 3.3.3) erreicht. Die Wiederholrate kann mit der Variable *Frequenz* frei gewählt werden.

Der zweite Ausgang ist für die Ansteuerung des auf einem Galvanometer befestigten Silberspiegels und somit für den B-Scan vorgesehen (vgl. Abschnitt 3.4.1). Mit dem Galvanometer kann der Silberspiegel in Abhängigkeit einer Spannung gekippt werden. Die am Ausgang erzeugte Ansteuerspannung wird an eine für den Galvanometerscanner mitgelieferte, spezielle Steuerplatine gegeben, so dass die Spannung in einen direkt proportionalen Winkel des Spiegels übersetzt wird. Nachdem ein A-Scan erfolgt, also ein Durchlauf der aus dem ersten Ausgang gegebenen Steuerkurve vergangen ist, wird die Spannung des zweiten Ausgangs und somit der Winkel des Spiegels im Probenarm um einen gewissen Wert verändert. Mit den Variablen *Galvo-Start* und *Galvo-Stop* können die Anfangs- und Endposition bzw. -winkel des Spiegels eingestellt werden. *Galvo-Schritt* gibt die Schrittweite an, bestimmt also den Abstand zweier benachbarter A-Scans und definiert mit den ersten beiden Variablen zusammen die Anzahl der A-Scans in einem B-Scan. Über die Rücklaufverzögerung kann die Zeit eingestellt werden, mit der der Galvanometerspiegel nach Beendigung eines B-Scans in die Ausgangsposition zurückläuft, so dass eine mögliche Dejustage durch das Zurückschnellen verhindert wird. Die Anzahl der B-Scans kann mit *Galvo-Durchläufe* eingestellt werden.

Der dritte Ausgang ist für die Synchronisation bzw. Separation der A- und B-Scans zuständig. Mit Hilfe der Variablen *Trigger1* und *Trigger2* können zwei unabhängige TTL-Trigger an die n-te Position der Steuerkurve gesetzt werden, die sich zur Trennung der benachbarten A-Scans eignen.

Der vierte Ausgang wird zum Start der Datenaufnahme genutzt, da man mit *Galvo-Trigger* einen TTL-Trigger an den Anfang des n-ten A-Scans setzen kann. Die übrigen Variablen dienen der Kommunikation mit der seriellen Schnittstelle und müssen – einmal eingestellt – nicht verändert werden.

Die Funktionsweise der Steuerplatine und die Datenaufnahme verdeutlicht Abbildung 3.3.4. Diese zeigt die Bedienoberfläche des *Saturn-Systems*, nachdem zwei benachbarte A-Scans aufgenommen worden sind. Im zentralen Fenster werden die aufgenommenen Signalamplituden der einzelnen Kanäle in Abhängigkeit der Zeit dargestellt, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Amplituden aus Gründen der Darstellung gestreckt, gestaucht und in der Höhe verschoben worden sind.

Die grüne Kurve *P3* repräsentiert die Spannung der Ansteuerung der Verzögerungsstrecke und ist ein Maß für die Auslenkung des Spiegels. Dieser fährt nach einem A-Scan in die Ausgangslage zurück.

Die weiße Kurve *P1* stellt die am Galvo liegende Spannung bzw. den Winkel des Probenarmspiegels dar. Der Änderung des Winkels wird nach der Beendigung eines A-Scans getätigt und fällt mit dem Trigger aus dem dritten Ausgang der Steuerplatine, hier illustriert durch die rote Kurve bzw. den Peak *P2*, zusammen. In der digitalen Nachverarbeitung werden die einzelnen A-Scans genau durch diesen Trigger voneinander getrennt.

Die violette Kurve *P5* stellen die eigentliche Messung dar. In diesem Beispiel wurde die Autokorrelation mit Hilfe eines Silberspiegels im Probenarm gemessen, so dass die Peaks als Reflexionen von der Spiegeloberfläche zu interpretieren sind. Auffällig ist jedoch, dass pro A-Scan zwei Peaks zu erkennen sind, einer auf der steigenden und ei-

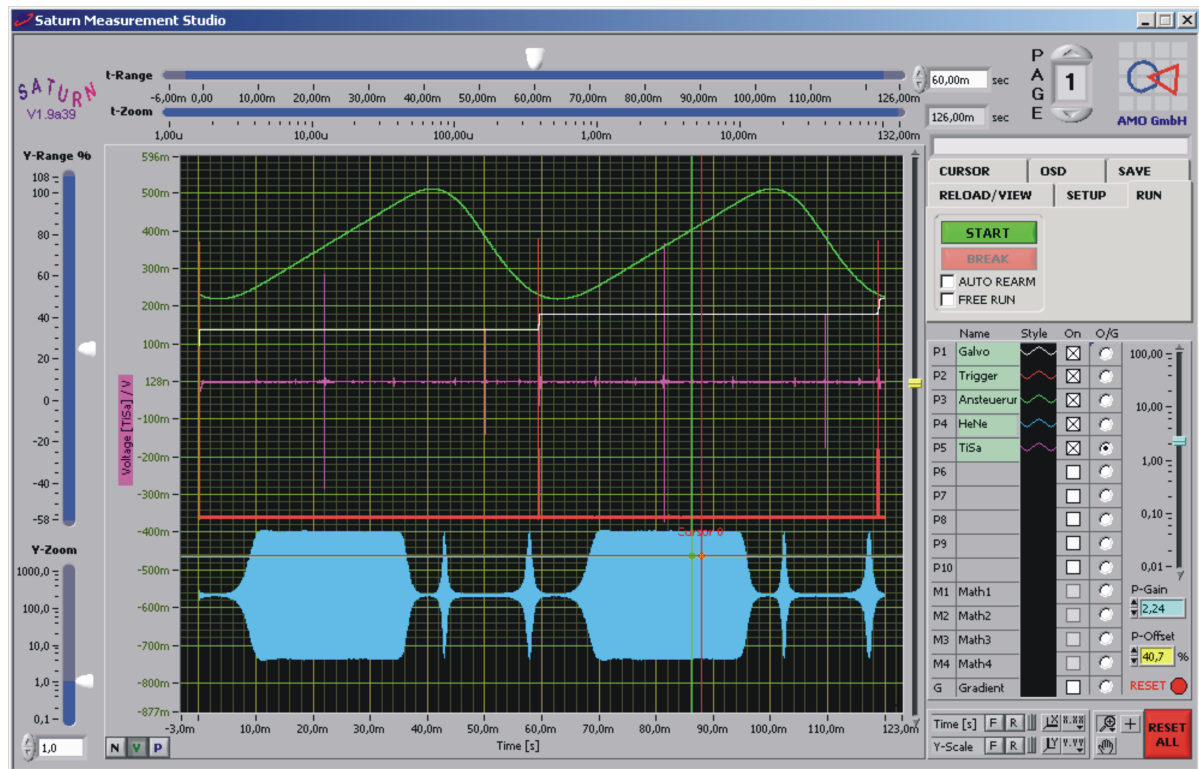


Abbildung 3.3.4: Datenkanäle von zwei benachbarten A-Scans dargestellt in der Bedienoberfläche des Datenerfassungssystems

ner auf der fallenden Flanke des Ansteuersignals. Letzterer entsteht unerwünschterweise beim Rücklauf des Referenzspiegels und wird in der Nachverarbeitung verworfen. Da das kontrollierte Zurückschnellen des Referenzspiegels einen kleineren Zeitraum einnimmt als die Auslenkung, erreichen weniger Photonen den Detektor, so dass die Amplitude des Signals auf dem Rückweg reduziert wird.

Die blaue Kurve *P4* veranschaulicht das bandpassgefilterte Interferenzsignal eines HeNe-Lasers, der mit Hilfe eines zusätzlichen externen Michelson-Interferometers die Referenzspiegelposition misst. Der Bandpass ist auf die Trägerfrequenz des Signals angepasst, welche von der mittleren Geschwindigkeit in der aufsteigenden Flanke der Ansteuerung des Referenzarms bestimmt wird. Es gibt also nur genau dann ein Signal, wenn die geschwindigkeitsabhängige Modulationsfrequenz innerhalb der elektronischen Bandbreite des Filters liegt, so dass die zwei Peaks in der absteigenden Flanke entstehen, wenn die mittlere Geschwindigkeit, auf die der Bandpass eingestellt ist, über- bzw. unterschritten wird. Während *P3* das Maß für die Soll-Position des Referenzspiegels angibt, stellt *P4* ein Maß für die Ist-Positionen für jeden individuellen A-Scan des Spiegels dar.

Diese Messungen wurden von dem hier nicht dargestellten Trigger über den vierten Ausgang der Ansteuerplatine ausgelöst und fassen auf einen Blick die für das SOCT-System bedeutsamen Abläufe zusammen.

3.4 Optomechanik

Die optomechanischen Komponenten zeichnen sich dadurch aus, dass zentrale Eigenschaften des SOCT-Systems, wie z.B. Bildqualität im Allgemeinen, oder Frequenzauflösung im Speziellen durch die Wechselwirkung von Mechanik und Optik, wie. z.B in der Strahlführung, charakterisiert werden. In diesem Fall gibt es nur zwei bewegliche Elemente, den Galvanometerscanner im Probenarm und die Verzögerungsstrecke des Referenzarms.

3.4.1 Probenarm

Das Galvanometer *QS-7* mit montiertem Silberspiegel wurde mit der Steuereinheit *QD 1500* von der Firma *Nutfield Technologies* geeicht geliefert. Als Linse wurde der schon erwähnte NIR-Achromat der Firma *Edmund Optics GmbH* mit einer Brennweite von 35 mm verwendet. Zum Aufbau wurden sowohl die im Labor vorhandenen Halter als auch selbst konstruierte und durch die Mechanikwerkstatt des IHT gefertigte Halterungen verwendet.

Der Aufbau des Probenarms ist simpel. Der Galvo (hier abkürzend für Galvanometerspiegel) wird in die Null-Position gefahren und so in den Strahlengang gestellt, dass der Lichtstrahl mittig und im 45°-Winkel auf den Spiegel trifft. Der Strahl wird dann senkrecht zum einfallenden Strahl durch die Mitte der Linse gelenkt, welche ihn auf die Probe fokussiert.

Damit bei der Rotation des Galvos und somit beim Verfahren des Lichtstrahls über die Probe gewährleistet werden kann, dass die zurückreflektierten bzw. -gestreuten Photonen immer auf dem gleichen Weg zurück gelangen, auf dem sie auch zur Probe gelangt sind, werden Galvo, Linse und Probe in eine Fresnelanordnung gestellt. Dies bedeutet, dass der Abstand zwischen Galvo und Linse sowie Linse und Probe immer der Brennweite der Fokussierlinse, hier 35 mm, entsprechen muss. Somit trifft der Strahl immer im rechten Winkel auf die Probe. Diese Anordnung garantiert, dass die von der Probe zurückgestreuten Photonen über den Galvo und das Interferometer immer im gleichen Strahlengang auf den Dioden landen.

Die Anordnung kann mit Hilfe eines Silberspiegels als Probe justiert werden. Diese als Linien-Verbreiterungs-Funktion (aus dem engl. Line-Spread-Function oder LSF) bekannte Abbildung ist ein Maß für die Abweichung des OCT-Systems von einem perfekten Interferometer. Die LSF gibt an wie eine perfekte Gerade, hier ein Silberspiegel mit einer durchschnittlichen Oberflächenrauigkeit von $\lambda/10$, durch das Interferometer abgebildet wird.

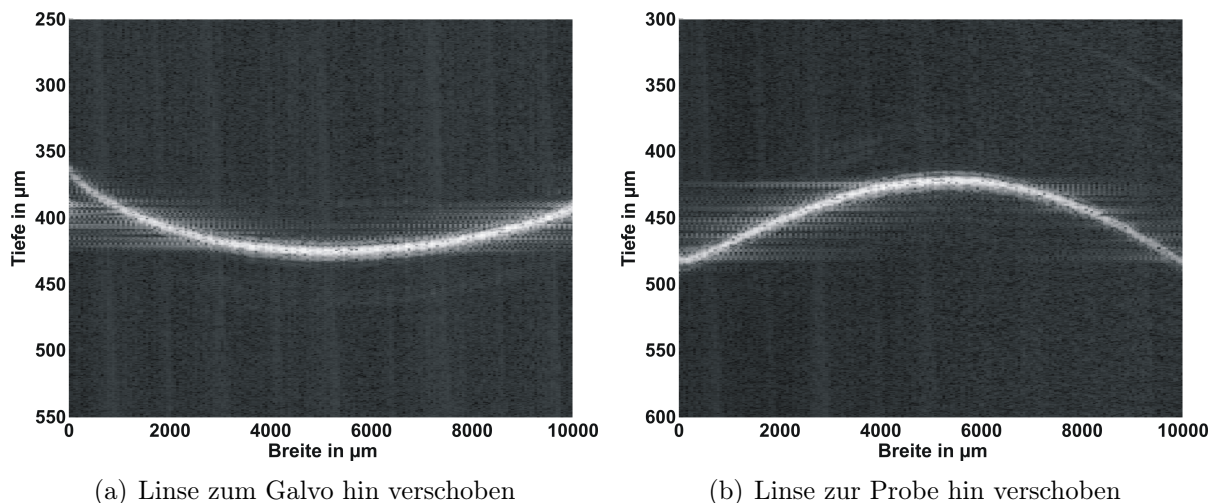


Abbildung 3.4.1: **Justage des Linsenabstandes der Probenarmlinse zwischen Galvanometerscanner und Probe**

Wie aus Kapitel 2 bekannt ist, kann das Interferometer als ein lineares Übertragungssystem aufgefasst werden, dessen Abbildung als Faltung der Impulsantwort mit der Amplitudenrückstreuungsfunktion beschrieben wird. Die Amplitudenrückstreuungsfunktion beinhaltet nicht nur die Eigenschaften der Probe, sondern spiegelt auch den Charakter der in dem Aufbau eingesetzten Komponenten wider. In diesem konkreten Fall bedeutet das, dass wenn sich der Galvo und die Probe nicht genau in den zwei Brennpunkten der Linse befinden, so wird der Spiegel in einem B-Scan nicht als Linie, sondern als Parabel unterschiedlicher Krümmung durch das OCT-System abgebildet. In Abbildung 3.4.1 wurde die Linse einmal in Richtung Probe und einmal in Richtung Galvo verschoben. Dies verursacht einen Vorzeichenwechsel in der Krümmung der abgebildeten Parabel.

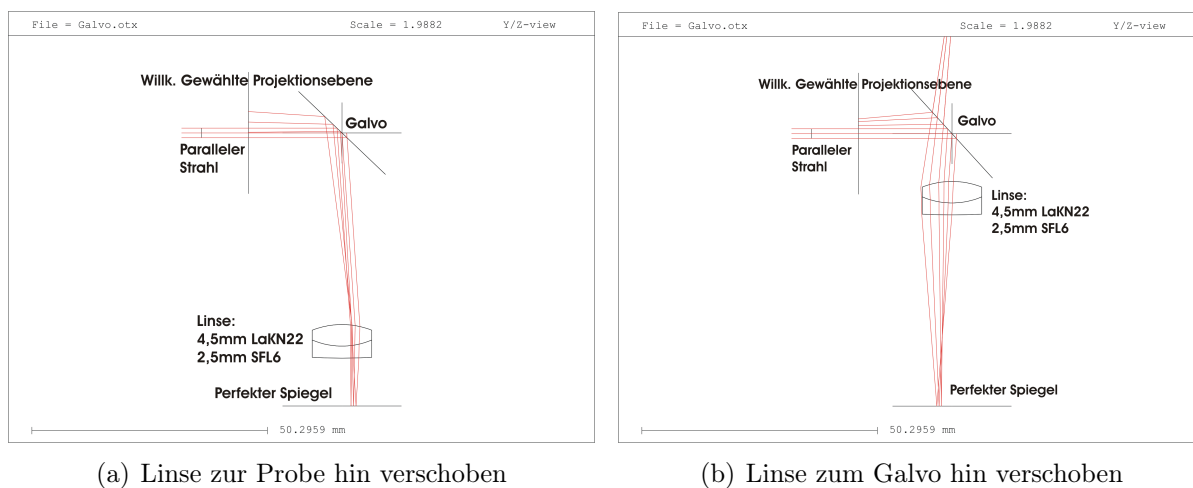
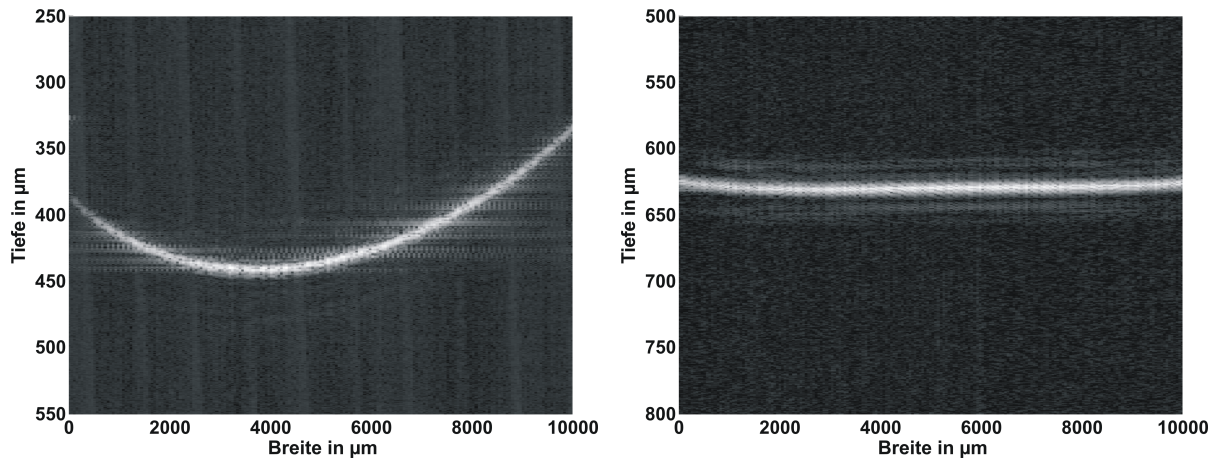


Abbildung 3.4.2: **Simulation des Strahlenganges im Probenarm für einen NIR-Achromaten mit 25 mm Brennweite**

Durch die Simulation dieser Anordnung unter Zuhilfenahme des optischen Simulationsprogrammes *Optalix* kann gezeigt werden, dass es sich dabei um einen Effekt rein geometrischer Natur handelt. Die Linse mit einem Durchmesser von ca. 12 mm wird in einem B-Scan von 10 mm Breite komplett von links nach rechts durchfahren, wenn man den Strahldurchmesser des Lasers von ca. 3 mm berücksichtigt. Da die Linse in den Randbereichen schmaler ist als in der Mitte, werden je nach Position der Linse verschiedene optische Weglängen durch den Lichtstrahl zurückgelegt. Ferner trifft der Lichtstrahl – abweichend von der Fresnelanordnung – über den gesamten B-Scan nicht im rechten Winkel auf die Probe. Dies schlägt sich in der Krümmung der abzubildenden Gerade nieder. In Abbildung 3.4.2 können die Strahlengänge für zwei verschiedene Linsen- und Galvostellungen stellvertretend für die durchgeführten Berechnungen betrachtet werden. Diese sind zwar für eine Linse mit 25 mm Brennweite durchgeführt worden, sind jedoch auf höhere Brennweiten übertragbar.

Mit dieser Methode kann ebenfalls ein seitlicher Versatz der Linse detektiert und somit korrigiert werden. In Abbildung 3.4.3(a) ist eindeutig zu sehen, wie die dejustierte Linse den Spiegel in einer seitlich versetzten Parabel abbildet.



(a) Linse zur Probe hin verschoben und seitlich versetzt

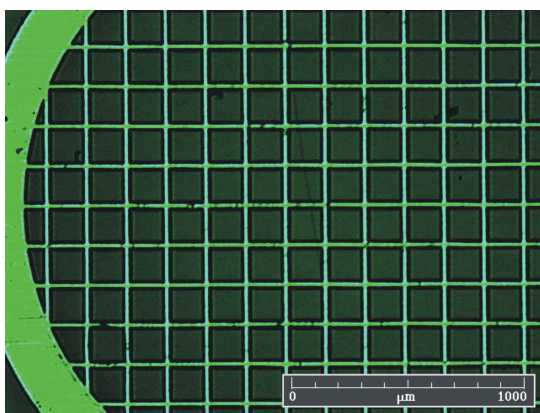
(b) Korrekt justierte Linse in Fresnel-Anordnung

Abbildung 3.4.3: Justage des Linsenabstandes der Probenarmlinse zwischen Galvanometerscanner und Probe

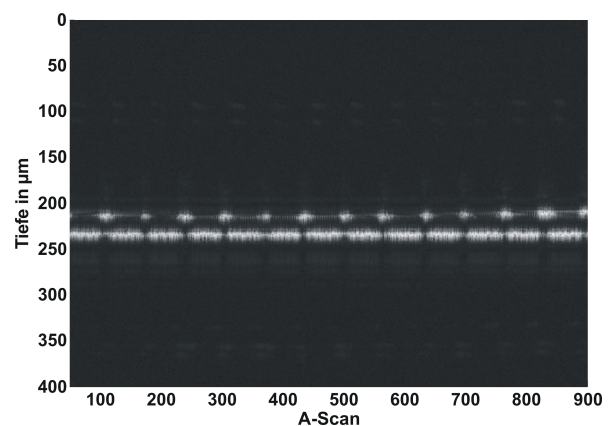
In den drei oben diskutierten OCT-Bildern sind nicht nur die Krümmungen auffällig, sondern auch die Schlieren in den Randbereichen, die durch geometrische Rückreflexe des Laserstrahls in den Randbereichen der Linse bzw. des Linsenhalters verursacht werden. Sie können nahezu vollständig durch eine Blende, die zwischen *ST3* und dem Galvo gestellt wird, eliminiert werden. Das korrekte Schnittbild eines Silberspiegels nach der Linsenjustage und der Einführung einer Lochblende ist in Abbildung 3.4.3(b) gezeigt. Die verbleibende Krümmung in den Randbereichen kann vernachlässigt werden, da diese in der Größenordnung der Kohärenzlänge liegt. Darüber hinaus beträgt der abgetastete Bildausschnitt im Allgemeinen nur die Hälfte bis drei Viertel der hier abgebildeten Strecke.

Die in den Bildern zu sehende Tiefenskala wurde anhand des zum OCT-Signal parallel aufgenommenen HeNe-Lasers erstellt, während die Breitenskala durch das im Folgenden erläuterte Eichverfahren generiert wurde.

Die an das Galvanometer angelegte Spannung ist proportional zur Winkelauslenkung des Galvanometerspiegels. Wie weit die Spannung den fokussierten Laserstrahl über die Probe führt, muss indes experimentell ermittelt werden. Mit Hilfe eines TEM-Gitters, welches in der Transmissionselektronenmikroskopie zum Fixieren einer Probe verwendet wird, kann diese fehlende Variable durch eine Messung bestimmt werden. Zunächst wird die Gitterkonstante des Gitters mit Hilfe eines Mikroskops ermittelt. Ein Ausschnitt davon ist in Abbildung 3.4.4(a) dargestellt.



(a) Mikroskopaufnahme eines TEM-Gitters



(b) OCT-Bild aus 850 A-Scans des TEM-Gitters - Gemessen mit einer Schrittweite von 1

Abbildung 3.4.4: TEM-Gitter abgebildet durch ein Mikroskop und das OCT-System

Aus dem Intensitätsprofil des Mikroskopbildes kann die Gitterkonstante zu $170\ \mu\text{m}$ bestimmt werden. Das Galvanometer wird mit einer Spannung von $\pm 2\ \text{Volt}$ angesteuert, welche eine 12 Bit Quantisierung durch die Ansteuerplatine erhält. Die kleinste herauszugebende Ansteuerspannung ist also $\frac{4V}{4096} \approx 10^{-3}\ \text{V}$. Um die Linearität zwischen Ansteuerspannung und Galvoauslenkung bzw. Schrittweite des Lasers über die Probe zu überprüfen, wurde das TEM-Gitter auf einen Silberspiegel gelegt und mit drei verschiedenen Schrittweiten (einzustellen mit der Variable *Galvo – Schritt* an der Ansteuerplatine) ausgemessen. Ein für die drei Messungen repräsentatives Schnittbild ist in Abbildung 3.4.4(b) gegeben. Während die Querstreben des TEM-Gitters knapp unterhalb einer Tiefe von $200\ \mu\text{m}$ als von links nach rechts laufende helle Punkte zu erkennen sind, wird der Spiegel durch die querlaufenden, etwa 80 A-Scans langen hellen Streifen oberhalb einer Tiefe von $250\ \mu\text{m}$ dargestellt. Die dunklen Stellen in der abgebildeten Spiegeloberflächen resultieren durch das abschirmende Verhalten der stark reflektierenden metallischen Gitterquerstreben.

Übereinstimmend lässt sich aus allen drei Messungen die kleinste, einzustellende Schrittweite $\frac{13 \times 170 \mu m}{850 A - Scans} = 2,60 \frac{\mu m}{A - Scan}$ berechnen. Da in allen drei Messungen dieser Wert auf die dritte Nachkommastelle genau bestimmt werden konnte, kann ein hohes lineares Verhalten des Galvos angenommen werden.

Das transversale Auflösungsvermögen Δx lässt sich mit der Schrittweite des Galvanometers in Beziehung setzen. Die eingesetzte Glasfaser mit einer numerischen Apertur von 0,13, welche das Licht zum Interferometer transportiert und mittels NIR-Achromaten (Brennweite: 12 mm) kollimiert, resultiert in einem Strahldurchmesser d von 3,12 mm. Dieser ergibt mit der Probenarmlinse einen Fokusbereich von:

$$\Delta x = \frac{4\lambda_C f}{\pi d} = 11,43 \mu m. \quad (3.4.1)$$

Die kleinste Schrittweite beträgt etwa ein Viertel des Fokusbereichs, so dass dadurch bereits eine laterale Überabtastung erreicht werden kann. Die über die Rayleigh-Länge definierte Tiefe z_{max} , die noch scharf abgebildet werden kann, ist somit:

$$z_{max} = 2\pi \frac{(\Delta x)^2}{\lambda_C n} = 686 \mu m \quad \text{bzw.} \quad 912 \mu m \quad \text{in Luft.} \quad (3.4.2)$$

Hier wird der in Kapitel 2 erwähnte Kompromiss zwischen Tiefenschärfe und transversaler Auflösung deutlich.

3.4.2 Referenzarm

Im Vergleich zu den optomechanischen Komponenten im Probenarm kommt den Bauteilen im Referenzarm hinsichtlich der wichtigsten Leistungsmerkmale eines SOCT-Systems eine größere Bedeutung zu. Die Bildgebungstiefe, die Linearität und die Aufnahmezeit des Systems werden maßgeblich durch den Aufbau der Verzögerungsstrecke im Referenzarm bestimmt.

Die Bildgebungstiefe wird, wie schon in Kapitel 2 erwähnt, durch die Auslenkung des Referenzspiegels bestimmt, weswegen eine möglichst hohe Auslenkung des Spiegels angestrebt wird. Das Absorptions- und Streuverhalten einer biologischen Probe in dem durch die Lichtquelle determinierten Wellenlängenbereich um 800 nm schränkt die maximal abzubildende Tiefe auf etwa 2 mm ein. Weiterhin bewirkt der im vorherigen Abschnitt angesprochene Kompromiss zwischen lateralem Auflösungsvermögen und Tiefenschärfe, dass die effektive Bildgebungstiefe auf etwa 1 mm herabgesetzt wird.

Die Linearität der Spiegelauslenkung muss gewährleistet werden, damit eine eindeutige Beziehung zwischen der zurückgestreuten optischen Lichtwellenlänge λ_C und der elektronischen Trägerfrequenz f_T herrscht. Diese sind folgendermaßen über die Spiegelschwindigkeit v verknüpft:

$$f_T = 2 \frac{v}{\lambda_C}. \quad (3.4.3)$$

Ist die Linearität der Auslenkung nicht gegeben, so werden nicht nur die relativen Größenverhältnisse der Probe unkorrekt abgebildet, sondern es können die spektralen Informationen nicht eindeutig interpretiert werden. Die Geschwindigkeit sollte also im Idealfall in dem zu messenden Bereich konstant sein und muss bekannt sein, damit eine eindeutige Zuordnung möglich ist.

Die Aufnahmezeit bezieht sich auf die Periode eines einzelnen A-Scans. Sie gibt also an, wie schnell ein Tomogramm aufgenommen werden kann. Bei einer üblichen Aufnahmezeit von 50 Hz dauert es 4 s bis ein Bild aus 200 A-Scans aufgenommen ist. Vergleicht man diese Geschwindigkeit mit einer Bildwiederholungsrate von 25 Bildern pro Sekunde handelsüblicher Fernsehgeräte, so wird klar, dass die Steigerung der Aufnahmezeit in der OCT, insbesondere hinsichtlich einer *in vivo*-Messung, erstrebenswert ist.

Diese drei zentralen Merkmale stehen unmittelbar in Konkurrenz zueinander. Da die Verzögerung mechanisch erfolgt und die Eigenfrequenz optischer Bauelemente im Bereich einiger weniger hundert Hertz liegt, ist eine Erhöhung der Aufnahmezeit mit der Anregung dieser Resonanzen verbunden. Das zur Folge hat, dass die Linearität darunter leidet. Ferner stehen sich eine gleichzeitige Maximierung von Aufnahmezeit und Bildgebungstiefe im Wege, da eine höhere Auslenkung bzw. Bildgebungstiefe immer mehr Zeit in Anspruch nimmt als eine niedrige Bildgebungstiefe. Linearität und Bildgebungstiefe stehen sich gegenüber, wenn der Messbereich soweit ausgedehnt wird, dass in den Umkehrpunkten der Verzögerungsmechanik hohe Beschleunigungen auftreten, welche wiederum Eigenresonanzen des mechanischen Systems anregen. Wie auch schon im Probenarm muss hier ein Kompromiss gefunden werden.

In Analogie zu den in der Literatur vorgestellten OCT-Systemen wurde eine Verzögerungstrecke konstruiert, welche die Weglängendifferenz mit Hilfe einer spannungsinduzierten Dehnung eines Piezoaktors erzeugt [5]. Diese Aktoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich auf wenige Nanometer genau positionieren lassen. Ihr Hub ist allerdings auf ein bis zwei Promille der Eigenlänge beschränkt. Im Hinblick auf eine Integration der Verzögerungstrecke in einen abgeschlossenen Aufbau sollte der Aktor eine gewisse Dimension nicht überschreiten. Außerdem muss beachtet werden, dass die Kapazität des Piezoaktors, die mit der Aktorlänge steigt, gering genug ist, damit die zur Verfügung stehenden Spannungsverstärker genügend Leistung für den dynamischen Betrieb des Piezos liefern. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurde ein Piezoaktor *PSt 150/5/60 VS10* der Firma *Piezomechanik GmbH* verwendet, welcher einen maximalen Hub von 60 μm bis 80 μm verspricht und bereits vorgespannt in einem Kupfergehäuse geliefert wurde. Der Kupfermantel sorgt für einen verbesserten Abtransport der Wärme, welche im dynamischen Betrieb des Aktors entsteht und sich nachteilig auf seine Eigenschaften, wie z.B. Kapazität, Hysterese, Hub, etc. auswirkt.

Es stellte sich heraus, dass die am IHT vorhandenen Verstärker nicht leistungsstark genug waren, um dem Piezoaktor im dynamischen Betrieb oberhalb von 10 Hz zu seinem vollen Hub zu verhelfen. Es wurde ein Spannungsverstärker mit Hilfe des invertiert betriebenen Operationsverstärkers *PA-92* der Firma *APEX* konstruiert, der genügend Strom liefern konnte. Der Schaltplan für diesen Spannungsverstärker kann Abbildung 3.4.5 entnommen werden.

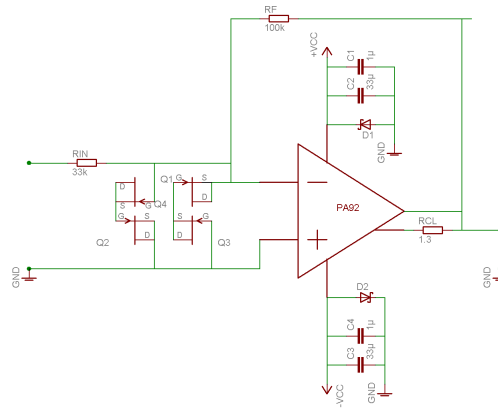


Abbildung 3.4.5: Schaltplan eines Spannungsverstärkers für einen Piezoaktor, der Spannungen bis 200V und Ströme bis 2A liefert

Die JFET-Transistoren vor den Eingängen des Operationsverstärkers sind als Dioden zum Überspannungsschutz des sehr empfindlichen Verstärkers geschaltet. Auch die Zenerdioden sind zum Schutz vor Überspannung seitens der Spannungsquelle eingesetzt worden. Während die Kondensatoren entstören, begrenzt R_{CL} den Strom.

Da schon zu Beginn des Aufbaus feststand, dass der Gesamthub eines Piezos nicht genügen würde, um eine Auslenkung von 1 mm oder mehr zu erreichen, wurde mit Hilfe von rechteckigen Spiegeln (20x30 mm) eine Anordnung des Strahlenganges realisiert, in der die Auslenkung des Piezoaktors die optische Verzögerung um ein Vielfaches des eigenen Hubs vergrößert. Eine schematische Darstellung dieser Anordnung kann in Abbildung 3.4.6 betrachtet werden.

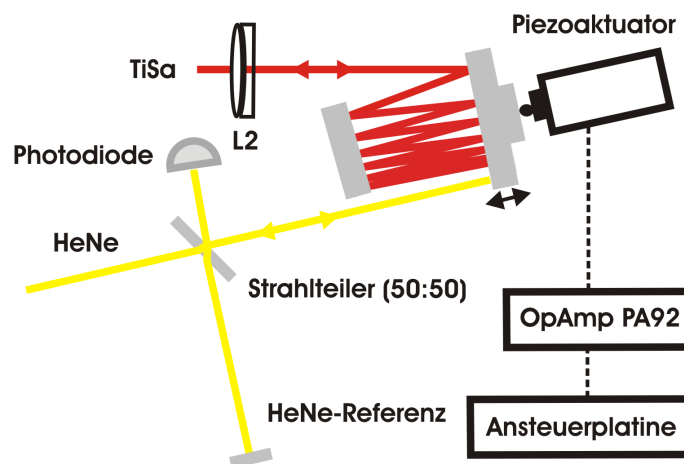


Abbildung 3.4.6: Schematische Darstellung des Strahlenganges und der Verzögerungsstrecke im Referenzarm

Der plan-konvexe NIR-Achromat (Brennweite 200 mm) fokussiert den Strahl des Ti:Saphir-Lasers in die Spiegelanordnung, damit er nicht vom Rand des zur Linse gewandten Spiegels gestört wird. Die zwei Spiegel sind so positioniert, dass ihre verspiegelten Flächen in einem kleinen Winkel keilförmig zueinander stehen. Die Anordnung muss so justiert werden, dass die letzte Reflexion zwischen den Spiegeln nicht nur im rechten Winkel auf einen der Spiegel fällt, sondern auch so, dass dieser Punkt im Fokus der Linse sitzt. Damit wird ein maximaler, für die Interferenz mit dem Probenstrahl essentieller Überlapp des Strahlengangs garantiert.

Wird der Piezoaktor, der mit einem der Spiegel in Kontakt steht, um eine Strecke x verfahren, so ändert sich die Weglänge für den Laserstrahl um die doppelte Strecke multipliziert mit der Anzahl der Reflexionen auf beiden Spiegeln. Bei der Berechnung der Eindringtiefe fällt der Faktor Zwei wieder heraus, da der Strahl auch im Probenarm die doppelte Wegstrecke (einmal zur Probe hin und wieder zurück) zurücklegt. Mit dieser Technik lässt sich durch einen kleinen mechanischen Stellweg eine beliebig große optische Weglängendifferenz erzeugen.

Jedoch ist zu beachten, dass mit der Zunahme der Ausdehnung des Spiegels und dem Anstieg der zu beschleunigenden Masse eine Abnahme der Linearität einhergeht. Ferner multipliziert sich nicht nur die Weglänge mit jeder Reflexion, sondern auch jede Nichtlinearität. Nichtsdestotrotz kann mit einem Hub von $60\ \mu\text{m}$ und 30 Reflexionen, welche bei der verwendeten Spiegelgröße realistisch sind, eine Verzögerung von $1,8\ \text{mm}$ erreicht werden. Diese können zur Bildwiedergabe zwar nicht komplett genutzt werden, doch selbst wenn nur auf der Hälfte der Strecke gemessen werden kann, entspricht das dem noch scharf abzubildenden Bereich z_{max} .

Damit bei steigender Aufnahmezeit eine hohe Linearität auf der gesamten zur Bildgebung gewünschten Strecke gewährleistet werden kann, wurden verschiedene Maßnahmen zur Beseitigung bzw. Minimierung auftretender Nichtlinearitäten durchgeführt. Die Eigenschwingungen der Mechanik, die sich auf den zu bewegenden Silberspiegel übertragen, stellen die größte Herausforderung im Bau einer Verzögerungstrecke dar. Sie werden durch ein optimales Design der Spiegelhalterung und der zu bewegenden Mechanik auf ein Minimum reduziert.

Durch die Manipulation der Form der Ansteuerkurve, welche den Piezoaktor zum Auslenken anregt, kann nicht nur dem hysteretischen Verhalten des Aktuators entgegen gewirkt werden, sondern es können dadurch auch Resonanzen vermieden werden. Dabei helfen elektronische Filter, welche die für den Aufbau charakteristischen Eigenfrequenzen aus dem Ansteuersignal dämpfen.

Die aktive Nachführung der Spiegelposition stellt die effektivste Möglichkeit dar, Nichtlinearitäten aus dem Aufbau zu minimieren. Sie ist jedoch in ihrer Realisierung besonders zeitaufwendig und muss auf das jeweilige Problem maßgeschneidert werden.

Eine besonders vielversprechende Technik zur Linearisierung liegt in der digitalen Nachverarbeitung des aufgenommenen Interferenzsignals. Ist die Position bzw. die Geschwindigkeit des Spiegels zu jedem Zeitpunkt bekannt, so kann sie dem Interferenzsignal als Basis dienen, Abweichungen von einer mittleren Geschwindigkeit zu korrigieren.

Sowohl für die Positionsbestimmung als auch für die allgemeine Untersuchung der Spiegelbewegung wurde ein Michelson-Interferometer in den Referenzarm eingeführt, das zunächst in der in Abbildung 3.4.6 zu sehenden Anordnung aufgebaut wurde. Als Lichtquelle für dieses Interferometer wurde ein Helium-Neon-Laser (HeNe) eingesetzt. Obwohl dieser Laser eine Kohärenzlänge von mehreren Zentimetern aufweist, müssen die Abstände des Referenz- und Probenarmspiegels vom Strahlteiler auf wenige Millimeter genau justiert werden, damit eine maximale Signalintensität gewährleistet ist.

Die Spiegelposition kann aus dem gemessenen Interferenzsignal extrahiert werden. Es ist aus Kapitel 2 bekannt, dass sich eine Weglängendifferenz zwischen den Spiegeln des Referenz- und Probenarms als Phase im Interferenzsignal G_{PR} bzw. der Kohärenzfunktion Γ_{PR} bemerkbar macht:

$$\Gamma_{PR}(t) = A_{\Gamma}(t)e^{i\Phi_{\Gamma}(t)} = 1 \cdot \exp(i4\pi \frac{v_{Spiegel}}{\lambda_c} t + \alpha). \quad (3.4.4)$$

Aufgrund der hohen Kohärenzlänge des HeNe-Lasers kann die Einhüllende $A_{\Gamma}(t)$ der Kohärenzfunktion auf dem zu messenden Weg von maximal 2 mm als konstant bzw. Eins angenommen werden. Aus der Winkelbeziehung komplexer Zahlen folgt für den vom Spiegel zurückgelegten Weg $s(t)$ durch elementare Umformung (vgl. Gleichung 2.1.9):

$$s(t) = \frac{\lambda_c}{4\pi} \arctan\left[\frac{HT\{G_{PR}(t)\}}{G_{PR}(t)}\right] \quad (3.4.5)$$

Diese Gleichung beschreibt die Transformation des gemessenen Interferenzsignals in die komplexe Ebene, wobei der Winkel zwischen dem Interferenzsignal und seiner Hilberttransformierten linear proportional zur Auslenkung des Spiegels ist. Erreicht der Winkel nach einem Umlauf der komplexen Ebene 2π , so hat sich der Spiegel um $\frac{\lambda_c}{2}$ der Zentralwellenlänge des Lasers λ_c bewegt. Diese Demodulation des Interferenzsignals hat gegenüber der Zählung der Extrema bzw. der Nullstellen den großen Vorteil, dass alle Punkte zur Berechnung der Positionen berücksichtigt werden, so dass jedem Punkt im SOCT-Signal eine Position zugeordnet werden kann.

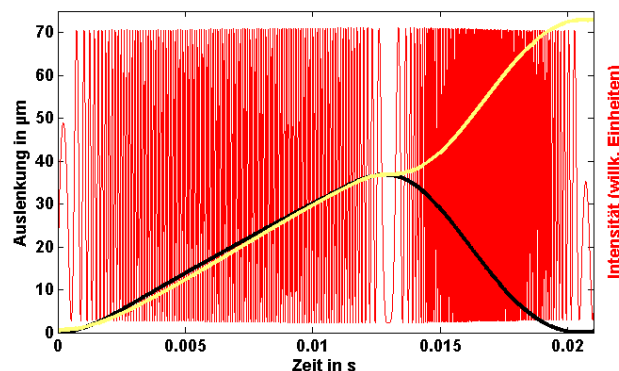


Abbildung 3.4.7: Berechnung der Referenzspiegelposition aus dem Interferenzsignal des HeNe-Interferometers für einen A-Scan

In Abbildung 3.4.7 ist die Ansteuerkurve des Piezoaktors, das Interferenzsignal und das daraus berechnete Positionssignal des Spiegels als Funktion der Zeit für einen A-Scan mit 50 Hz dargestellt. Die schwarze Kurve in Abbildung 3.4.7 repräsentiert den an den Piezoaktor angelegten zeitabhängigen Spannungsverlauf. Dieser ist auf die maximale Auslenkung des Spiegels normiert, so dass er mit der gemessenen Wegstrecke skaliert. Die rote Kurve stellt das aufgenommene Interferenzsignal dar. Die gelbe Kurve zeigt die aus dem Interferenzsignal gewonnene Position des Spiegels. Die Umkehrpunkte des Spiegels sind deutlich am linken und rechten Ende und bei einer Zeit von etwa 0,013 s im Graphen zu erkennen. Obwohl diese im Verlauf der schwarzen (Soll-Position) und gelben (Ist-Position) Kurve zusammenfallen, fällt auf, dass die gelbe Kurve im Rücklauf des Spiegels invertiert ist und von der schwarzen Kurve im linearen Anstieg abweicht. Wie bereits in Gleichung 3.4.5 angedeutet, wird die Position bestimmt, indem die Interferenzringe gezählt und die zurückgelegten Strecken aufsummiert werden. Dadurch kann ein Richtungswechsel nicht berücksichtigt werden, so dass nur der absolut zurückgelegte Weg berechnet wird. Für die weitere Verarbeitung der Daten spielt das jedoch keine Rolle, da jeder A-Scan individuell nachbearbeitet und die Information aus der absteigenden Flanke nicht für die Bildgebung genutzt wird. Die Diskrepanz der aufsteigenden Flanke zwischen der Soll- und Ist-Position im linearen Bereich ist sowohl auf die Hysterese des Piezoaktors als auch die Trägheit des Spiegels zurückzuführen. Durch eine entsprechende Korrektur der Ansteuerkurve kann dem entgegengewirkt werden.

Üblicherweise werden Verzögerungsstrecken, wie z.B. Shaker, mit einer sinusförmigen Spannungskurve bei der Resonanzfrequenz der zu bewegenden Mechanik betrieben. Das soll nicht nur eine maximale Auslenkung hervorrufen, sondern auch das Anregen anderer Schwingungsmoden dämpfen.

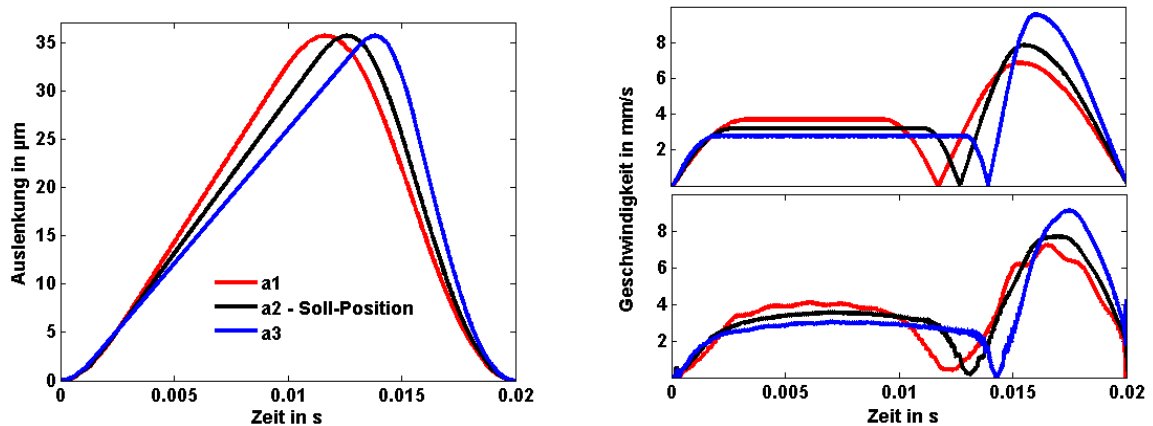
Damit die für die OCT charakteristisch hohe Empfindlichkeit von über 100 dB erreicht werden kann, ist der Einsatz steiler Bandpassfilter mit geringer Bandbreite erforderlich. Zu diesem Zweck muss die Modulationsfrequenz, die direkt proportional zur Spiegelgeschwindigkeit ist, auf einer möglichst langen Strecke, der gewünschten Bildgebungstiefe, konstant gehalten werden, was die Form der in Abbildung 3.4.7 dargestellten Ansteuerkurve rechtfertigt.

Zusätzlich ist zu beachten, dass die von der Diode aufgenommene Lichtintensität mit zunehmender Detektionszeit bzw. abnehmender Geschwindigkeit zunimmt, so dass das Interferenzsignal im Fall einer sinusförmigen Ansteuerkurve eine unerwünschte Amplitudenmodulation erfährt.

Als Ausgangsbasis für die Konstruktion der Ansteuerkurve dient die Hanning-Fenster-Funktion, deren aufsteigende Flanke durch eine Gerade ersetzt worden ist und die in den Berührungspunkten der Fenster-Funktion selbst nach der ersten Ableitung stetig differenzierbar bleibt. Dadurch, dass das Hanning-Fenster auf der cos-Funktion beruht, ist gewährleistet, dass weniger harmonische Frequenzen höherer Ordnung angeregt werden als im Fall eines Polynoms.

3 Aufbau

Um einen Kompromiss zwischen Bildgebungstiefe (Länge des linearen Anstiegs) und der Linearität (Position des Scheitelpunkts) zu finden, wurde eine optimale Ansteuerkurve durch die Generation einer Kurvenschar unterschiedlicher Scheitelpunkte und Anstiegsgeraden für eine feste Anregungsfrequenz experimentell bestimmt. In Abbildung 3.4.8 können, repräsentativ für das Experiment, drei Kurven einer generierten Schar und ein Vergleich der damit verbundenen erwarteten und gemessenen Geschwindigkeit betrachtet werden.



(a) Kurvenschar – Variation der Scheitelpunktsposition

(b) Vergleich der absoluten Soll- und Ist-Geschwindigkeit des Referenzspiegels im linearen Anstieg der Ansteuerkurve

Abbildung 3.4.8: **Schar dreier Ansteuerkurven und Vergleich von angestrebter (oben) und gemessener (unten) Spiegelgeschwindigkeit für einen A-Scan**

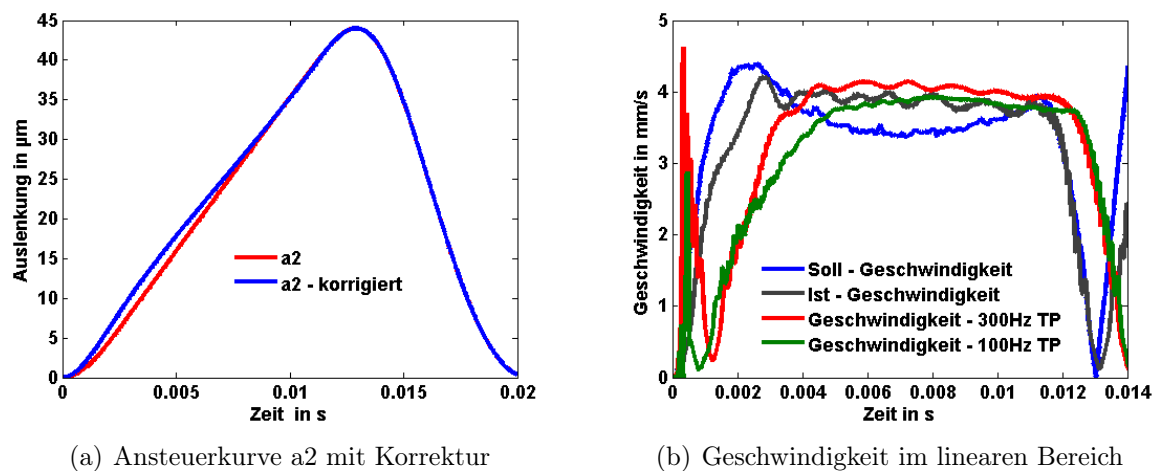
In Abbildung 3.4.8(a) sind drei Ansteuerkurven als Funktion der Zeit präsentiert, welche sich in der Position ihres Scheitelpunkts, der Geradensteigung und der Rücklaufzeit unterscheiden.

Der daraus resultierende, absolute, zeitabhängige Geschwindigkeitsverlauf kann im oberen Graphen der Abbildung 3.4.8(b) betrachtet werden. Da nur eine positive Positionsänderung gemessen werden kann, ist auch hier die absolute Geschwindigkeit dargestellt. Erwartungsgemäß steigt die mittlere Geschwindigkeit im linearen Bereich mit einer Zunahme der Geradensteigung der Ansteuerkurve. In den Umkehrpunkten beträgt die Geschwindigkeit Null.

Im unteren Graphen von Abbildung 3.4.8 sind die entsprechenden mit dem HeNe-Interferometer gemessenen Geschwindigkeiten als Funktion der Zeit aufgetragen. Es fällt auf, dass der Spiegel dem vorgegebenen Geschwindigkeitsverlauf in allen drei Fällen, insbesondere im linearen Bereich, nicht folgen kann. Dieses Verhalten ist auf die Trägheit des Spiegels zurückzuführen, da die Krümmung im linearen Bereich mit einem Anstieg der mittleren Geschwindigkeit skaliert. Außerdem ist zu bemerken, dass sowohl die rote als auch die blaue Kurve stärkere Oberschwingungen aufweisen als die schwarze Kurve.

Im ersten Fall ist das auf eine zu hohe Anfangsbeschleunigung und im zweiten Fall auf ein zu schnelles Zurückschnellen des Spiegels zurückzuführen. Die schwarze Ansteuerkurve stellt also einen Kompromiss beider Phänomene dar.

Um den gekrümmten Verlauf im linearen Bereich der Ansteuerkurve zu begradi- gen, wurde ein Algorithmus geschrieben, der die gemessene Ansteuerkurve an ihrem ursprünglichen Verlauf bzw. dem gewünschten linearen Teil spiegelt. Der daraus berech- nete Kurvenverlauf wurde dann als neue Ansteuerspannung genutzt. Ein Vergleich dieser Kurve mit der ursprünglichen Ansteuerkurve kann in Abbildung 3.4.9 betrachtet werden.



(a) Ansteuerkurve a2 mit Korrektur

(b) Geschwindigkeit im linearen Bereich

Abbildung 3.4.9: **Korrektur der Ansteuerkurve und Linearisierung der Geschwindigkeit mit Hilfe eines analogen Tiefpasses für einen A-Scan**

Abbildung 3.4.9(a) zeigt die korrigierte Kurve und die ursprüngliche Ansteuerkurve als Funktion der Zeit. Beide sind auf den Hub des Piezoaktors normiert. Wie schon in Abbildung 3.4.7 zu sehen, muss die Ansteuerkurve im linearen Bereich bauchförmig übersteuert werden, damit der Trägheit des Spiegels Rechnung getragen wird.

Die blaue Kurve in Abbildung 3.4.9(b) zeigt den aus der Korrektur abgeleiteten zeitlichen Geschwindigkeitsverlauf im gewünschten linearen Bereich. Die aus Abbildung 3.4.8(b) bekannte Krümmung der Geschwindigkeit soll durch die in der Korrektur generierte entgegengesetzte Krümmung kompensiert werden. Betrachtet man die daraus resultierende gemessene Geschwindigkeit des Spiegels, dargestellt durch die schwarze Kurve, so ist der Verlauf begradigt worden. Durch die hohe Anfangsbeschleunigung wird allerdings die Eigenfrequenz (etwa 700 Hz) der Halterung verstärkt angeregt. Neben der Eigenfrequenz können noch weitere Oberschwingungen in dem Geschwindigkeitsverlauf beobachtet werden, welche auf ein in der Elektronik entstandenes Rauschen zurückzuführen sind. Um die in der Elektronik und der Ansteuerkurve entstandenen Resonanzen zu dämpfen, wurde ein Tiefpass mit einer Grenzfrequenz von 300 Hz (-3 dB) zwischen die Ansteuerplatine und den Spannungsverstärker geschaltet. Die rote Kurve zeigt, dass

die Oberschwingungen, die durch das elektronische Rauschen entstehen, verschwunden sind, während die Eigenresonanz nur leicht gedämpft werden konnte. Außerdem ist eine durch den analogen Filter entstandene Phasenverschiebung zu beobachten.

Die grüne Kurve zeigt, dass die Eigenschwingung zwar mit einem Tiefpass mit niedrigerer Grenzfrequenz (100 Hz – -3 dB) effektiv unterdrückt werden kann, jedoch muss eine Reduktion der Bildgebungstiefe in Kauf genommen werden. Obwohl die hier gezeigten 44 μm noch nicht am Maximum der Piezoauslenkung sind, reichen die 30 μm im linearen Bereich aus (abgeschätzt aus den roten Kurven beider Graphen), um zusammen mit 30 Spiegelreflexionen eine Bildgebungstiefe von 0,9 mm zu gewährleisten. Jedoch ist eine Abweichung von der mittleren Geschwindigkeit in der Größenordnung von etwa 5% hinsichtlich der Mittenfrequenz des Bandpasses und einer Frequenzanalyse nicht akzeptabel. Bevor weitere Maßnahmen zur Linearisierung diskutiert werden, ist eine genauere Kenntnis der Ursachen von Eigenschwingungen notwendig.

Aufgrund der relativ hohen Ausdehnung des Referenzspiegels (20x30x5 mm) treten neben longitudinalen auch transversale Schwingungsmoden (eine Verkipfung des Spiegels) auf. Während longitudinale Schwingungen sich als Frequenzmodulation im Interferenzsignal bemerkbar machen, verursachen transversale Moden zusätzlich zur Frequenzmodulation eine Amplitudenmodulation des Interferenzsignals. Diese beschränkt sich nicht nur auf das HeNe-Signal, sondern moduliert auch das OCT-Signal. Wie genau die Amplitudenmodulation entsteht und erkannt werden kann, soll im Folgenden anhand von Abbildung 3.4.10 erläutert werden.

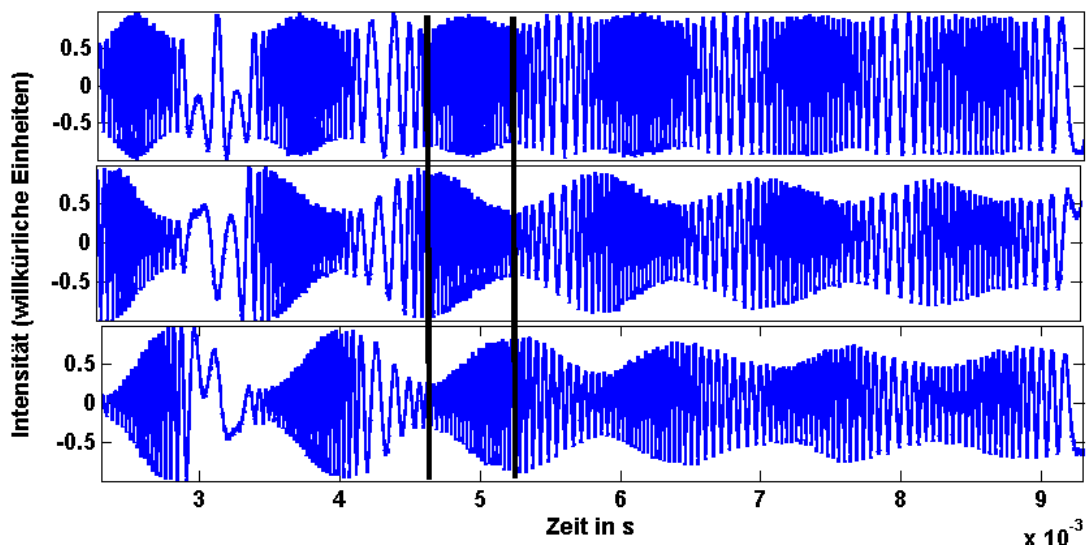


Abbildung 3.4.10: Amplituden- und Frequenzmodulation im linearen Bereich des HeNe-Interferenzsignals bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz für drei verschiedene Stellungen des Referenzspiegels des HeNe-Interferometers

Die drei Graphen in Abbildung 3.4.10 zeigen das Interferenzsignal dreier A-Scans im linearen Bereich der Ansteuerkurve als Funktion der Zeit. Eine Repetitionsrate von 100 Hz wurde gewählt, damit die Amplitudenmodulation gut zu sehen ist. In allen drei Graphen, wie auch in Abbildung 3.4.9(b), nehmen die Modulationen und die damit verbundenen Schwingungen mit der Zeit ab. Bis auf kleine Unterschiede in der Frequenzmodulation des Interferenzsignals der drei Graphen, welche auf eine nicht zu vernachlässigende Individualität der Spiegelbewegung eines jeden A-Scans hinweist, variiert die Amplitudenmodulation signifikant von Graph zu Graph. Eine Phasenverschiebung in der Modulation ist sowohl am Anfang der Graphen als auch an den durch die schwarzen Balken markierten Stellen deutlich zu erkennen. Am zeitlichen Ende der Graphen ist kein Unterschied in der Amplitudenmodulation zu erkennen, da dort die maximale Auslenkung des Spiegels erreicht ist.

Eine Amplitudenmodulation eines Interferenzsignals ist im Allgemeinen entweder auf eine Schwebung oder aber auf eine periodische Variation der Lichtintensität zurückzuführen. Hier ist letzteres der Fall. Es ist davon auszugehen, dass die Intensität des HeNe-Laserstrahls im Profil von der Mitte nach außen hin monoton, oftmals gaußförmig, abfällt. Während im HeNe-Interferometer Referenz- und Probenstrahl für eine Interferenz auf der Photodiode zwischen Strahlteiler und Diode im Idealfall kollinear übereinander liegen, wandert bzw. schwingt der vom bewegten Spiegel kommende Strahl bei seiner Verkippung über den fixen, vom Referenzspiegel des HeNe-Interferometers reflektierten Strahl. Das führt aufgrund der relativen Bewegung der zwei Intensitätsprofile der Laserstrahlen zueinander zu einer Amplitudenmodulation im Interferenzsignal.

Bei einer kollinearen Justage treffen sich die Maxima der Intensitätsprofile aus Referenz- und Probenarm bei einer einzigen Verkippung des Spiegel um die Ruhelage zweimal (oberer Graph). Wird der feststehende Referenzstrahl des HeNe-Interferometers mit Hilfe der Spiegeljustage aus der Kollinearität geschoben, so dass sich die Intensitätsmaxima bei einer Verkippung nicht mehr kreuzen, so bleibt nur noch ein Maximum in der Amplitudenmodulation übrig (mittlerer Graph). Bei einer Verkippung wandert bzw. schwingt das Maximum des einen Strahls auf der Detektorfläche nur noch auf der Intensitätsflanke des anderen Referenzstrahls. Verschiebt man den Referenzstrahl aus dieser Position bezüglich der kollinearen Justage auf die gegenüberliegenden Intensitätsflanke, so verschiebt sich die Amplitudenmodulation – über den zuerst diskutierten Fall der Doppelmaxima hinweg – um π (unterer Graph). In den beiden, zuletzt genannten Fällen ist die mittlere Amplitude der Intensität erwartungsgemäß kleiner als im Fall der kollinearen Justage, was sich auch in den drei Graphen widerspiegelt.

Mit dieser Technik kann durch Verschiebung des Referenzarmspiegels im HeNe-Interferometer die genau Achse, um welche die Verkippung des bewegten Spiegels erfolgt, bestimmt werden. Ist das genaue Strahlprofil bekannt, so kann aus der Amplitudenmodulation des Interferenzsignals der Grad der Verkippung quantifiziert werden. Dadurch, dass der Winkel der Verkippung mit der Anzahl der Reflexionen zwischen den Spiegeln multipliziert wird, können kleinste Neigungen erfasst werden bzw. wirken sich kleinste Verkippungen auf das Interferenzsignal aus. Dadurch, dass mechanische transversale und longitudinale Schwingungsmoden differenziert werden konnten, wurden ihre Ursachen experimentell erfasst und in den mechanischen Konstruktionen berücksichtigt. Folgende

Ursachen können für die jeweiligen Moden aufgeführt werden:

Longitudinale Schwingungsmoden sind hauptsächlich auf das wohlbekannte Kräftegleichgewicht zwischen der vom Piezoaktor zu beschleunigenden Masse m und der Rückstellkraft der Feder zurückzuführen, die den Spiegel samt Halterung in die Ausgangslage befördert und eine Federkonstante D besitzt. Aus der Mechanik idealer Körper ist bekannt, dass die Resonanzfrequenz f der mit einer Federkraft verbundenen punktförmigen Masse m gegeben ist durch:

$$f = \sqrt{\frac{D}{m}}. \quad (3.4.6)$$

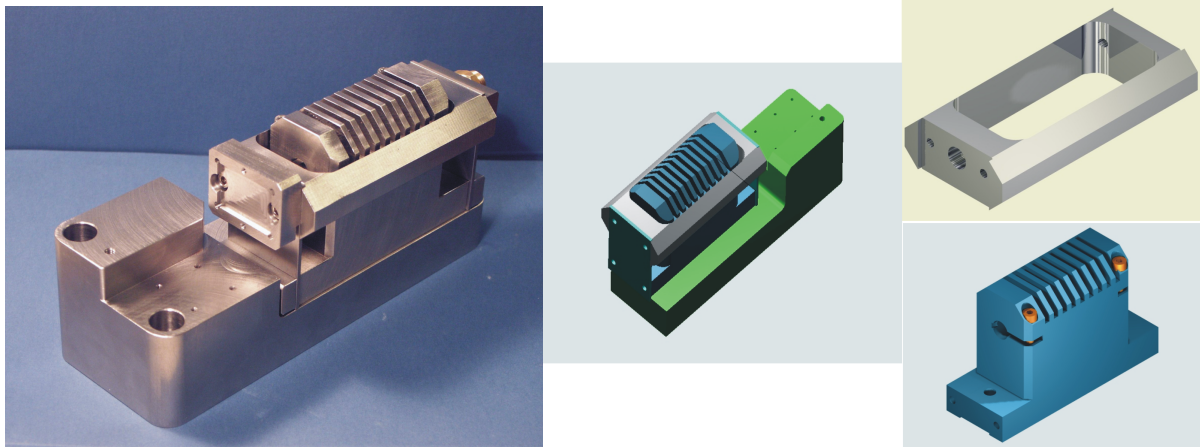
Das bedeutet, dass entweder die Masse des Aufbaus reduziert werden oder aber die Federsteifigkeit erhöht werden muss. Die erste Maßnahme hat zur Folge, dass die Führung des Spiegels leidet, was eine verstärkte Verkippung mit sich bringt. Erhöht man die Steifigkeit der Feder, so wird der Hub des Aktors reduziert.

Transversale Schwingungsmoden sind hauptsächlich auf ungleichmäßige Führung des ausgedehnten Spiegels zurückzuführen. Verkippungen entstehen z.B., wenn der Spiegel bzw. die Halterung bei der Beschleunigung nicht genau im Schwerpunkt unterstützt wird oder die Halterung verschiedenen und aus unterschiedlichen Richtungen kommenden Spannungen ausgesetzt ist. Weiterhin spielen Nichtlinearitäten an den Berührungspunkten sich gegeneinander bewegender Komponenten, wie z.B. im Kugellager, eine Rolle. Eine verbesserte Führung wird im Allgemeinen nur durch eine prinzipielle Neukonstruktion der Halterung erreicht und ist verbunden mit einem Zuwachs an Masse, was wiederum longitudinale Schwingungsmoden begünstigt. Summa summarum muss ein optimales Design als Kompromiss zwischen Führung und Masse des Systems gefunden werden.

Für die erste Verzögerungsstrecke wurde der rechteckige Spiegel auf einen gewöhnlichen Spiegelhalter geklebt, welcher wiederum auf einem linearen Verschiebetisch montiert war. Diese Anordnung wurde auf einer Halterung montiert, in die der Piezoaktor so eingelassen wurde, dass er den Verschiebetisch auslenken konnte. Dieser wurde durch seine interne Feder vorgespannt gegen den Aktor gedrückt, damit eine dauerhafte Berührung beider über die gesamte Verfahrstrecke garantiert werden konnte. Ungeachtet dessen traten sowohl Amplituden- als auch Frequenzmodulation selbst bei kleinsten Anregungsfrequenzen (unterhalb von 20 Hz) auf, welche für das OCT-System nicht tolerierbar sind. Die diskutierten Interferenzsignale in Abbildung 3.4.10 entstammen diesem Aufbau und geben einen in das Extreme getriebenen Eindruck des Verhaltens wieder. Obwohl eine steifere und zum Schwerpunkt des Verschiebetisches verschobene Konstruktion des Spiegelhalters die Schwingungsmoden dämpfen konnte, wurden sie nicht auf ein notwendiges Maß reduziert.

Erst durch eine komplette Überarbeitung des eingesetzten Systems und einer neuen kugellagerfreien Konstruktion der Verzögerungsstrecke, konnte die Amplitudenmodulation soweit reduziert werden, dass die Frequenzmodulation lediglich von der longitudinalen

Schwingungsmode dominiert wird. In Abbildung 3.4.11 ist ein Photo der kompletten Verzögerungsstrecke (a) und Teile der mit CAD gezeichneten Komponenten (b) gezeigt.



(a) Verzögerungsstrecke von vorne gesehen (b) Verzögerungsstrecke von hinten gesehen – Schwingrahmen (oben) und Piezohalter (unten)

Abbildung 3.4.11: **Federgelenkbasierte Verzögerungsstrecke für einen Piezoaktor – ohne montierte Spiegel**

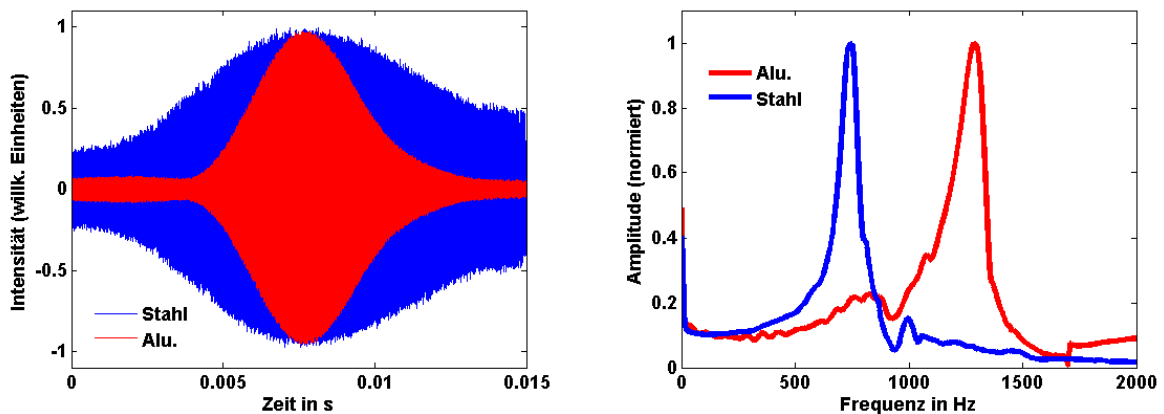
Zunächst wird der Piezoaktor in die Bohrung des Piezohalters (blaue Komponente in Abbildung 3.4.11(b) rechts unten) geschoben und mit den Schrauben festgeklemmt. Danach wird der Halter auf die Basis (grüne Komponente in Abbildung 3.4.11(b) links) geschraubt. Der Schwingrahmen (silberne Komponente in Abbildung 3.4.11(b) rechts oben) wird mit den Blattfedern (blaue Komponenten in Abbildung 3.4.11(b) links) verbunden, welche wiederum an den unteren Teil des Piezohalters montiert werden. Der Piezoaktor drückt also an den frei schwebenden Schwingrahmen, an dem ein Spiegelhalter (zu sehen in Abbildung 3.4.11(a) vorne) samt rechteckigem Silberspiegel befestigt ist, welcher durch die Blattfedern zurückgestellt wird. Die Vorspannung lässt sich durch die Position des Piezoaktors in der Bohrung variieren. Durch diese Konstruktion wird die Gleitreibung in der Bewegung vollständig eliminiert.

Das Interferenzsignal aus Abbildung 3.4.7, anhand derer die Berechnung der Referenzarmspiegelposition erläutert wurde, verdeutlicht die dadurch erzielte Verbesserung der Spiegelführung. Es ist auffällig, dass die Amplitude des Interferenzsignals vom Umkehrpunkt des Spiegels aus gesehen (bei etwa 0.013 s) zu den Rändern des Graphen abfällt. Durch entsprechende Justage des Referenzspiegels des HeNe-Interferometers lässt sich dieser Trend umkehren. Da diese Amplitudenmodulation unabhängig von der Repetitionsrate des Aktors ist, kann sie nur auf eine Verbiegung des gesamten Schwingrahmens bzw. einer unterschiedlichen Verbiegung der Blattfedern zurückzuführen sein. Dadurch wurde bestätigt, dass das Kugellager im ersten Aufbau für einen großen Teil der transversalen Moden verantwortlich ist. Die mit dieser Konstruktion durchgeführten Geschwindigkeitsmessungen werden in Abbildung 3.4.9(b) zusammenfassend wiedergegeben. Mit einer korrigierten Ansteuerkurve, welche zusätzlich mit einem Tiefpass gefiltert

wurde, konnte eine Linearität in der Größenordnung von 5% auf einer Strecke von etwa 1,3 mm erreicht werden, was im Vergleich zum ersten Aufbau eine Verbesserung um mehr als einen Faktor zwei bedeutet.

Um die Schwingungsmoden und die Geschwindigkeit so genau wie möglich zu erfassen wurde im nächsten Schritt das HeNe-Interferometer so positioniert, dass der Strahlengang des HeNe-Lasers parallel zum Strahlengang des Ti:Saphir-Lasers verläuft. Aus dem Verhältnis der Trägerfrequenzen beider Laser, kann überprüft werden, ob die Anzahl der Spiegelreflexionen der Strahlengänge beider Laser gleich sind, da die Modulationsfrequenz (vgl. Gleichung 3.4.3) von der Spiegelgeschwindigkeit und somit von der Anzahl der Reflexionen abhängt.

Weiterhin wurde die longitudinale Resonanzfrequenz des Aufbaus bestimmt, in dem der Piezoaktor als Kraftmesser Verwendung fand. Dazu schließt man den Piezoaktor an ein Oszilloskop bzw. das Datenerfassungssystem an, welche einen leichten Schlag auf den Schwingrahmen aufzeichnen. Aus der erfassten Spannung, die direkt proportional zur Auslenkung des Rahmens ist, lässt sich mittels Fouriertransformation die Frequenzantwort des Systems berechnen. Abbildung 3.4.12(b) zeigt die normierte Frequenzantwort der Verzögerungsstrecke für zwei unterschiedliche Materialien, während Abbildung 3.4.12(a) die dazu entsprechende werkstoffabhängige Amplitudenmodulation im ansteigenden Ast der Ansteuerkurve darstellt.



(a) Amplitudenmodulation im Aufstieg der Ansteuerkurve eines A-Scans

(b) Frequenzantwort

Abbildung 3.4.12: **Amplitudenmodulation und Frequenzantwort der Verzögerungsstrecke in Abhängigkeit der eingesetzten Werkstoffe**

Um die Linearität des Aufbaus zu erhöhen, sollte der Einfluss der Resonanz durch ihre Zunahme gesenkt werden. Da eine Erhöhung der Federsteifigkeit den Hub des Piezoaktors zu stark einschränkt, wurde dies durch eine Reduktion der Masse realisiert. Hierfür wurde der Schwingrahmen und der Spiegelhalter aus Stahl durch eine baugleiche Version aus dem etwa dreimal leichteren Aluminium ersetzt. Erwartungsgemäß und wie in Abbildung 3.4.12(b) zu sehen konnte durch diese Maßnahme die Resonanzfrequenz

des Stahlaufbaus (732 Hz) um den Faktor $\sqrt{3}$ auf 1282 Hz gesteigert werden. Obwohl eine Steigerung der Linearität eingetreten ist, wurde dieser Erfolg durch das unerwartete Auftreten einer erhöhten Amplitudenmodulation, wie sie in Abbildung 3.4.12(a) zu sehen ist, geschmälert. Aufgrund der Tatsache, dass der Strahl des HeNe-Laser in dieser Konfiguration die vollständige optische Weglänge erfährt, wird hier zum ersten Mal die gesamte Modulation bzw. der gesamte Fehler gemessen, dem auch der Ti:Saphir-Laser im Referenzarm ausgesetzt ist. Die blaue, für den Stahlaufbau repräsentative Kurve im Graphen 3.4.12(a) zeigt, dass die tatsächliche Amplitudenmodulation durch die Vielfachreflexionen sehr viel stärker ausfällt als aus Abbildung 3.4.7 zu erwarten wäre. Für die Frequenzmodulation hingegen konnte zu Anfang der Experimente eine hohe Korrelation zwischen einer Positionsmessung über eine Einfachreflexion des HeNe-Lasers und einer Vielfachreflexion des Ti:Saphir-Laser im *CW*-Betrieb gezeigt werden. Die rote, für den Aluminiumaufbau repräsentative Kurve zeigt, dass die Amplitudenmodulation durch den Wechsel zum Aluminiumrahmen stark zugenommen hat, was gleichzeitig die Bildgebungstiefe des OCT-Systems einschränkt. Selbst die Berechnung der Geschwindigkeit ist nicht mehr uneingeschränkt auf dem ganzen linearen Bereich möglich.

Das Aluminium zeichnet sich gegenüber dem Stahl nicht nur durch seine dreimal geringere Dichte aus, sondern es besitzt auch ein dreimal so hohes Elastizitätsmodul, womit sich die stärkere Verkippung des Spiegels erklären lässt. Dies macht den Einsatz eines im Vergleich zum Aluminium härteren, aber genau so leichten Materials notwendig. Abbildung 3.4.12 zeigt eindrucksvoll, dass ein Kompromiss zwischen Führung und Eigengewicht der Spiegelhalterung gefunden werden muss, der ein Gleichgewicht zwischen Linearität und Bildgebungstiefe mit sich bringt. Ferner kann festgehalten werden, dass eine beliebige Steigerung der optischen Weglängendifferenz durch eine Erhöhung der Anzahl der Spiegelreflexionen im Referenzarm nicht ohne einen entsprechenden Aufwand durchgeführt werden kann.

Basierend auf diesen Ergebnissen und um das Potential einer auf einem PI-Regler basierten Nachführung zu begutachten, wurde eine lineares, piezobasiertes Positioniersystem der Firma *Physik Instrumente* ausgeliehen, welches mit einer kapazitätssensorbasierten aktiven Regelung der Aktorposition ausgestattet ist und einen Stellweg von 240 μm besitzt. Nachdem ein dazu passender Spiegelhalter konstruiert wurde, konnte die Resonanzfrequenz der Positioniereinheit samt Spiegel zu 325 Hz bestimmt werden. Es konnte zwar eine Verkippung des Referenzspiegels festgestellt werden, jedoch spielte sie hinsichtlich einer Amplitudenmodulation des Ti:Saphir-Interferenzsignals keine Rolle. Dadurch, dass die Resonanzfrequenz im Vergleich zur vorherigen Konstruktion um mehr als die Hälfte geringer ist, wurde die Repetitionsrate des ausgeliehenen Systems zu Vergleichszwecken auf 30 Hz reduziert. Damit wurde das Verhältnis von Repetitionsrate zu Resonanzfrequenz der selbstkonstruierten Verzögerungsstrecke (50:732) so weit überschritten, dass eine Einschätzung der oberen Grenze für die geregelte Nachführung durchgeführt werden konnte.

Weiterhin wurde ein Algorithmus geschrieben, der anhand der durch das HeNe-Interferometer gemessenen Spiegelposition die Geschwindigkeit des OCT-Signals auf eine mittlere Geschwindigkeit korrigiert. Dazu wird jedem Punkt des Ti:Saphir-Interferenzsignals die aus dem HeNe-Interferenzsignal berechnete Position zugeordnet, so dass das

daraus resultierende OCT-Signal eine nichtäquidistante ortsabhängige x -Achse besitzt, welche auf die nichtlineare Bewegung des Referenzspiegel zurückzuführen ist. Mit Hilfe einer Spline-Interpolation wird dann das Interferenzsignal in einer Weise gestreckt bzw. gestaucht, dass die Punkte des Signals in einem äquidistanten Abstand liegen. Damit der Fehler dieser Linearisierung unterhalb von einem halben Prozent liegt, muss darauf geachtet werden, dass genügend Punkte für die Positionsbestimmung und die Spline-Interpolation zur Verfügung stehen. Eine siebenfache Überabtastung des OCT-Signals ist zu diesem Zweck mindestens notwendig.

Ferner wurde bemerkt, dass das Ti:Saphir-Interferenzsignal nach der Korrektur eine gewisse Restwelligkeit aufwies, welche mit der Eigenresonanz stark korrelierte und erst durch eine präzise kollineare Justage des HeNe-Lasers mit dem Ti:Saphir-Laser verschwand. Da der Strahl des HeNe-Lasers zwar parallel zu, aber oberhalb des Ti:Saphir-Laserstrahls verlief, erfuhr der HeNe-Strahl durch die Verkippung des Spiegels einen höheren Hub als der darunter liegende Ti:Saphir-Laserstrahl, was bei der Korrektur zu einer Überkompensation führte. Daraufhin wurde das HeNe-Interferometer in das OCT-Interferometer integriert und kollinear zum Ti:Saphir-Laser justiert. Eine schematische Darstellung dieses Aufbaus kann in Abbildung 3.4.13 betrachtet werden. Damit nicht auch das Interferenzsignal des HeNe-Lasers von den Doppeldioden detektiert wird, ist ein entsprechender Farbfilter (RG665) zum Einsatz gekommen. Der zum Experiment beitragende Strahlengang des Ti:Saphir-Lasers (rot) und des HeNe-Lasers (gelb) ist deutlich zu erkennen. Sowohl die in der Justage des Galvanometerscanners für notwendig befundene Blende ist der Skizze hinzugefügt worden als auch der in diesem Kapitel erläuterte elektronische Signalverlauf.

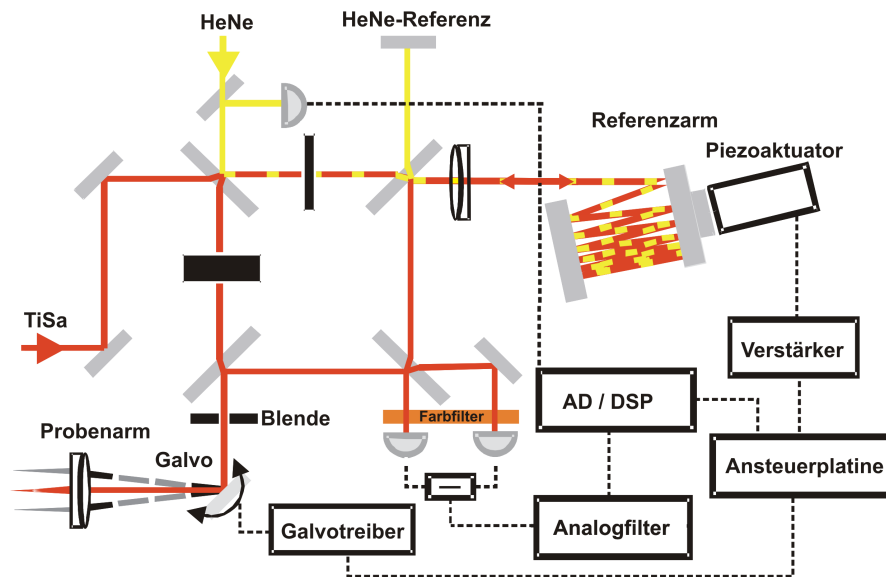


Abbildung 3.4.13: Finaler Aufbau des OCT-Freistrahlinterferometers mit integriertem HeNe-Interferometer zur Geschwindigkeitskorrektur

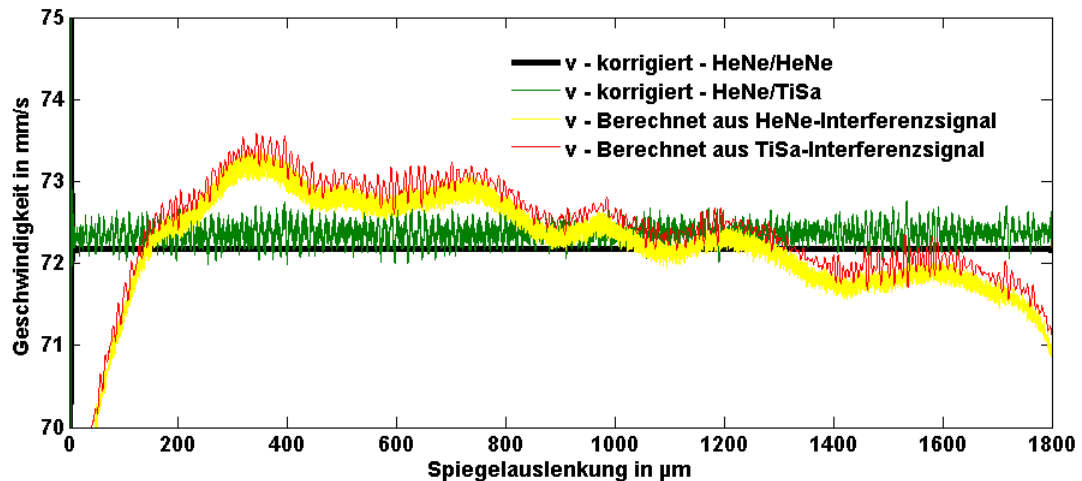


Abbildung 3.4.14: **Linearisierung der Geschwindigkeit mit Hilfe eines PI-Reglers und digitaler Nachverarbeitung für den linearen Bereich eines A-Scans**

Abbildung 3.4.14 zeigt die durch den PI-Regler und die digitale Positionskorrektur erreichte Linearisierung. Um die Kollinearität der Laser und den Fehler der Linearisierung zu messen, wurde zusätzlich zum Interferenzsignal des HeNe-Lasers auch das Interferenzsignal des Ti:Saphir-Laser im *CW*-Betrieb für mehrere A-Scans aufgenommen. Die daraus berechneten Spiegelgeschwindigkeiten im linearen Bereich der Ansteuerkurve sind im Graphen der Abbildung 3.4.14 als Funktion der Spiegelauslenkung dargestellt. Dass die zwei Geschwindigkeitskurven nicht übereinander liegen, ist auf die ungenaue Normierung zurückzuführen. Da es jedoch beim Vergleich beider Kurven hilft, wurde diese Ungenauigkeit nicht behoben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Verlauf beider Geschwindigkeiten – gelbe Kurve aus dem HeNe-Interferenzsignal und rote Kurve aus dem Ti:Saphir-Interferenzsignal – identisch ist, was bedeutet, dass die kollineare Justage erfolgreich durchgeführt wurde. Die hochfrequente Restwelligkeit auf den Geschwindigkeitskurven kann mit dem individuellen Rauschen eines jeden Lasers erklärt werden, während die langwellige Schwingung eindeutig auf die Resonanz der Mechanik zurückzuführen ist. Auffällig ist die mit zunehmender Spiegelauslenkung fallende Geschwindigkeit, welche auch in den vorherigen Konstruktionen zu beobachten war und durch die Trägheit des Spiegels erklärt werden kann. Obwohl dieser Effekt in den vorherigen Fällen größer ausfiel, bemerkt man ihn hier verstärkt, da die Vergrößerung des Graphen entsprechend hoch ist. Tatsächlich fällt die Geschwindigkeit des Spiegels nur um etwa 1% pro Millimeter Auslenkung, was etwa einem Drittel der Geschwindigkeitsabweichung der anderen Systeme entspricht. Darüber hinaus kann die Amplitude der Resonanz mit Hilfe der aktiven Nachführung und einer eingebauten Bandsperre auf eine Abweichung von ca. 1% der mittleren Geschwindigkeit reduziert werden, was zusammen mit dem Geschwindigkeitsabfall in einer Nichtlinearität von ca. 1,5% pro Millimeter Stellweg resultiert (gemessen von 400 μm bis 1400 μm). Es kann deshalb behauptet werden, dass eine aktive Regelung der Position eine vielver-

sprechende Maßnahme der Linearisierung darstellt, obwohl die Eigenschwingungen auch damit nicht vollständig beseitigt werden können.

Erst durch den Einsatz der digitalen Nachverarbeitung kann der Fehler in der Linearität auf das Rauschen des Lasers reduziert werden. Die schwarze Gerade in Abbildung 3.4.14 stellt die berechnete Geschwindigkeit aus dem HeNe-Interferenzsignal dar, welche zuvor durch das selbige korrigiert wurde. Dies soll beweisen, dass der geschriebene Korrekturalgorithmus funktioniert. Die grüne Kurve stellt die berechnete Geschwindigkeit aus dem Ti:Saphir-Interferenzsignal dar, welches zuvor mit dem HeNe-Positionssignal korrigiert wurde. Der gerade Verlauf veranschaulicht deutlich, dass die Linearisierung erfolgreich war. Das Muster der Restwelligkeit gleicht einer Mischung aus dem Geschwindigkeitsrauschen des Ti:Saphir-Lasers und des HeNe-Lasers, was konsequenterweise bedeutet, dass der Fehler der Linearität nur noch durch das Rauschen der eingesetzten Laser bestimmt wird. Der Fehler liegt bei weniger als 1% Prozent auf dem gesamten abgebildeten Stellweg. Es muss jedoch beachtet werden, dass eine digitale Linearisierung nur dann effektiv möglich ist, wenn die Intensität des Positionssignals hoch genug ist, was bei einer zu hohen Amplitudenmodulation nicht der Fall ist, und die Abweichungen von der mittleren Geschwindigkeit nur einige wenige Prozente beträgt. Ferner ist zu berücksichtigen, dass jeder A-Scan individuell korrigiert werden muss, da der Geschwindigkeitsverlauf zweier benachbarter A-Scans zu verschieden ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein vollständiger freistrahlbasierter OCT-Aufbau im Rahmen dieser Arbeit realisiert worden ist. Durch den Einsatz spezieller Strahlteiler lassen sich im Gegensatz zu einem faserbasiertem System hohe spektrale Bandbreiten über einen Wellenlängenbereich von mindestens 800 nm bis 1300 nm nutzen. Mit einer effektiven Dispersionskompensation ist es gelungen, das der optischen Bandbreite der Lichtquelle entsprechende, theoretisch mögliche Auflösungsvermögen von $3,52 \mu\text{m}$ (in Luft) zu erreichen. Sowohl durch die Optimierung der Strahlteilverhältnisse als auch durch die Verwendung eines balanced-detection-Schemas, durch die Konstruktion eines Bandpasses und den Einsatz eines rauscharmen Datenerfassungssystems konnte eine hohe Empfindlichkeit von 104 dB erzielt werden. Mit Hilfe des EECS wurde eine FPGA-basierte Ansteuerplatine zur Ansteuerung und Synchronisation des Galvanometerscanners, der Verzögerungsstrecke und des Datenerfassungssystems entwickelt. Im Probenarm des OCT-Interferometers wurde die Linse, durch die der Laserstrahl auf die Probe fokussiert wird, optimal justiert und die spannungsabhängige Schrittweite, mit der der Laserstrahl über die Probe fährt, anhand eines TEM-Gitters bestimmt. Im Referenzarm wurden durch die Untersuchung von verschiedenen linearen Verzögerungsstrecken die für den Bau einer Verzögerungsstrecke zentralen Charakteristika herausgearbeitet. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Maßnahmen zur Linearisierung der Geschwindigkeit vorgestellt und an den Positioniereinheiten durchgeführt. Die digitale Positionskorrektur hat sich hierbei als besonders effektiv herausgestellt, da sich Nichtlinearitäten in der Geschwindigkeit nach der digitalen Nachbearbeitung auf das Rauschen des Lasers beschränken.

4 Digitale Nachverarbeitung

In der klassischen OCT wird ein Schnittbild dadurch generiert, dass die Einhüllende des Interferenzsignals gemessen und in einer logarithmischen Skala in einem Graustufenbild dargestellt wird. Dabei ist die Amplitude der Einhüllenden repräsentativ für das Reflektivitätsprofil der Probe. Das bandpassgefilterte Diodensignal wird dafür mittels eines Verstärkers gleichgerichtet und logarithmisch verstärkt. Die Restwelligkeit des resultierenden Signals wird von einem Tiefpass entfernt, so dass das Signal digitalisiert und direkt in ein Graustufenbild übersetzt werden kann.

In der SOCT kommt nur noch der Bandpass zur Rauschunterdrückung in der Elektronik zum Einsatz. Es muss im Hinblick auf die spektroskopische Auswertung der Interferenzdaten auf die analoge Demodulation verzichtet werden. Da für die Beschreibung des Interferometers und somit des SOCT-Systems ein Ansatz aus der Signalübertragung gewählt wird, kann die Einhüllende unter Zuhilfenahme der Hilberttransformation über den Betrag der komplexen Kohärenzfunktion Γ_{PR} berechnet werden. Obwohl die Systemkomplexität durch Auslassen der analogen Demodulation reduziert wird, steigen die Anforderungen an das Datenerfassungssystem und den datenverarbeitenden Rechner.

Hinsichtlich der Datenmenge und der Aufnahmegeschwindigkeit muss beachtet werden, dass nicht mehr die Einhüllende abgetastet werden muss, sondern die hochfrequenten Interferenzdaten. Die minimale Abtastrate wird durch das Nyquist-Shannon-Theorem festgelegt. Hier ist das eingesetzte Saturnsystem mit einer Abtastrate von bis zu 100 MHz am Maximum der heutigen technischen Realisierbarkeit.

Im Hinblick auf die Bearbeitungsgeschwindigkeit stellen die Betragsbildung und Logarithmierung der Daten einen vergleichsweise geringen Rechenaufwand dar. Die Berechnung und Darstellung der Daten im Frequenzraum nimmt allerdings viel Zeit in Anspruch. Dies stellt sich für eine zukünftig gewünschte Echtzeitdarstellung als Herausforderung dar.

Unabhängig von diesen technischen Grenzen, muss nicht nur die Frage beantwortet werden, welche Art von zeitaufgelöster Frequenzanalyse einzusetzen ist, sondern es ist vielmehr ein für die quantitativen und qualitativen Eigenschaften des Gewebes repräsentatives Maß zur Darstellung nötig.

4.1 Zeitaufgelöste Frequenzanalyse

In den ersten Studien der SOCT (siehe [4, 11, 12]) wurde die Short-Time-Fourier-Transformation (STFT) dazu genutzt, das zeit- bzw. orts aufgelöste Spektrum aus den Interferenzdaten eines A-Scans zu berechnen. Ausgangspunkt für diese Transformation ist die Diskrete Fourier Transformation (DFT), welche in der Datenverarbeitung über den sehr effizienten Algorithmus der Fast Fourier Transformation (FFT) kalkuliert wird. Für die STFT multipliziert man das gewünschte Signal mit einer Fensterfunktion und berechnet die Fourierkoeffizienten für das ausgeschnittene Teilstück. Verschiebt man das Fenster über das Signal und berechnet die Fourierkoeffizienten für jedes einzelne Teilstück, das aus der Multiplikation des Signals mit dem verschobenen Fenster entstanden ist, so erhält man das zeit- bzw. orts aufgelöste Spektrum, die STFT.

Diese Frequenzanalyse besitzt den Nachteil der Zeit- und Frequenzunschärfe, welche man mit der Wahl der Fensterbreite beeinflussen kann. Wird das Signal mit einem kleinen Fenster multipliziert, so liefert dieses bei schlechter Frequenzauflösung eine gute Zeitauflösung und umgekehrt. Enthält nun ein Signal Frequenzanteile sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Frequenzen, möchte man bei niedrigen Frequenzen eine gute (absolute) Frequenzauflösung erzielen, da eine kleine absolute Frequenzänderung hier stark ins Gewicht fällt. Bei einer hohen Frequenz ist eine gute Zeitauflösung wichtiger, da eine vollständige Schwingung hier weniger Zeit beansprucht und sich die Momentanfrequenz daher schneller ändern kann. Dieser Nachteil kann durch andere Zeit-Frequenzanalysemethoden, wie z.B. der Wavelet-Transformation überwunden werden, in der, vereinfacht gesagt, die Fensterbreite variabel ist und sich an der gleich bleibenden Schwingungszahl pro Fenster orientiert. Neben dem höheren Rechenaufwand der Wavelet-Transformation ist das Auftreten von Mischtermen in der Interpretation der Frequenzanalyse von Nachteil. Hier zeichnet sich der fourierbasierte Ansatz durch seine Aussagekraft aus, denn die optische Wellenlänge steht über die bekannte Modulationsgeschwindigkeit in einem eindeutigen Bezug zur detektierten Frequenz.

In der Studie [25] wurden mehrere Zeit-Frequenzanalysealgorithmen sowohl in der Simulation als auch im Experiment verglichen. Obwohl die STFT im Vergleich zu den übrigen Transformationen weniger akkurat in der Berechnung der lokalen Spektren ist, zeichnet sie sich durch ihre Schnelligkeit aus. Insbesondere im Hinblick auf den Einsatz von NIR-Farbstoffen zur spektroskopischen Kontraststeigerung wurde die Verlässlichkeit und Aussagekraft anderen Algorithmen gegenüber hervorgehoben. Aus diesem Grund und wegen der Tatsache, dass das optische Spektrum des Ti:Saphir Lasers zu einem relativ schmalen elektronischen Frequenzband führt, das detektiert und ausgewertet werden muss, wird die STFT zur Frequenzanalyse verwendet.

Ferner wurde gezeigt, dass sich die Effizienz der STFT durch eine kleine Modifikation steigern lässt [17]. In diesem Fall wird der zu transformierende Frequenzbereich auf die optische bzw. auf die elektrische Bandbreite der Lichtquelle eingeschränkt. Dadurch, dass die DFT bzw. FFT, auf der die STFT basiert, das Spektrum immer bis zur Abtastrate f_S abbildet, fällt ein großer Teil der Punkte außerhalb der zu analysierenden Bandbreite. Diese Ineffizienz steigt je weiter man sich in der Abtastung von der Nyquistfrequenz entfernt, was üblicherweise gemacht wird, um die Signalqualität zu erhöhen und

das Aliasing bei der Digitalisierung zu eliminieren.

Durch den Einsatz der Chirp-Z-Transformation (CZT) ist es möglich, den Anfangs- und Endpunkt des Frequenzbereiches anzugeben, auf den die Transformation des Signals in den Frequenzraum erfolgen soll. Die spektrale Leistungsdichte der Kreuzkorrelation W_{PR} ist über eine L -punktige CZT der Kohärenzfunktion $\Gamma_{PR}(n)$ gegeben:

$$W_{PR}^{CZT}(k) = \sum_{n=0}^{L-1} \Gamma_{PR}(n) z^n e^{-irkn} \quad , \quad 0 \leq k < L - 1. \quad (4.1.1)$$

Wählt man $z = \exp(-2\pi f_0)$ und $r = 2\pi(f_1 - f_0)/L$, so kann mit Hilfe der Parameter f_0 der Anfangspunkt, mit f_1 der Endpunkt der Frequenztransformation bestimmt werden, so dass der Faktor r ein Maß für die Frequenzauflösung darstellt. Für den Fall, dass $z = 1$ und $f_1 - f_0 = 1$ sind, geht die CZT in die DFT über, so dass gezeigt ist, dass die DFT als ein Spezialfall der CZT zu betrachten ist. Von dem Standpunkt der Signalübertragung aus wird nicht mehr über den Einheitskreis der z -Ebene integriert, sondern vielmehr über eine beliebige Kurve in dieser Ebene.

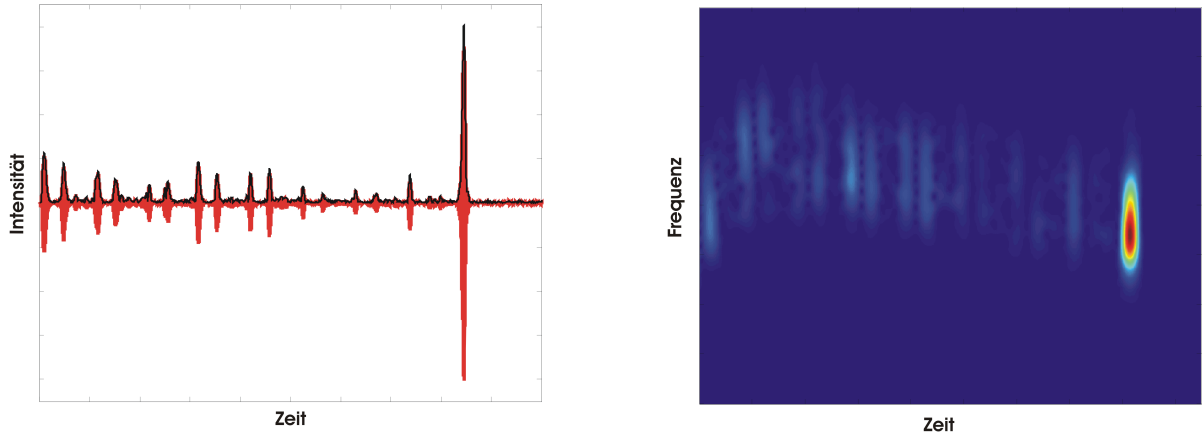
Konkret heißt das für eine Abtastrate von 2 MHz, eine Mittenfrequenz von 200 kHz, und eine Fensterbreite von 256 Punkten, welche einer Weglänge von 7,3 μm im Gewebe entspricht, dass im Falle der FFT nur etwa 5 Punkte in den Bereich der doppelten Bandbreite fallen würden, während man durch den Einsatz der CZT alle 256 Punkte zur Verfügung hat. Die CZT produziert also im Wesentlichen ein im Vergleich zur FFT glatteres Spektrum, welches sich jedoch vom Informationsgehalt einer entsprechenden FFT mit angehängten Nullen nicht unterscheidet. Diese Transformation ist lediglich nur eine Art Überabtastung, die den Rechenaufwand der STFT minimiert.

4.2 Bilderzeugung in der SOCT

Wie bereits schon in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt, stellt die Veranschaulichung der spektroskopischen Information eine Herausforderung dar. Verdeutlicht wird dies durch Abbildung 4.2.1.

Neben der Einhüllenden des Interferenzsignals (schwarze Kurve in Abbildung 4.2.1(a)), das die aus dem Gewebe ortsbezogene, zurückgestreute Lichtmenge repräsentieren soll, erhält man für jeden A-Scan über die STFT auch einen dreidimensionalen Datensatz der das lokale Spektrum widerspiegelt. Um diese zwei verschiedenartigen Darstellungsformen der Informationen in eine für den Betrachter verständliche und aussagekräftige Form zu bringen, muss der dreidimensionale Datensatz den zwei Dimensionen des Intensitätsprofils angepasst werden. Hierfür ist die Wahl eines Maßes nötig, welches die Eigenschaften des Gewebes repräsentiert.

Ein Maß, das in den ersten Studien der SOCT gewählt worden war, ist die Zentralwellenlänge des lokalen Spektrums, welches sich immer dann verschiebt, wenn Teile des Spektrums durch Streuung und Absorption im Gewebe verloren gehen. Insbesondere



(a) Interferenzsignal (rot) und Einhüllende (schwarz) einer Tesafilmrolle

(b) STFT von (a)

Abbildung 4.2.1: Interferenzsignal eines A-Scans im Zeit- und Frequenzraum

im Hinblick auf den Einsatz von Farbstoffen, deren Absorptionskanten im Wellenlängenspektrum der Lichtquelle liegen und damit die Zentralwellenlänge direkt beeinflussen, hat sich dieses Maß als besonders sinnvoll erwiesen. In dieser Arbeit ist jedoch nicht die Zentralwellenlänge bzw. Mittenfrequenz des Spektrums als Indikator genutzt worden, sondern der Frequenzschwerpunkt:

$$f_{SP} = \frac{\sum_k |W_{PR}^{CZT}(k)| f(k)}{\sum_k |W_{PR}^{CZT}(k)|}, \quad (4.2.1)$$

welcher empfindlicher auf eine absorptionsinduzierte wellenlängenabhängige Dämpfungen des Laserspektrums reagiert. Speziell in dem Fall, dass die wellenlängenabhängige Transmission des absorbierenden Mediums, sei es das reine Material oder ein eingebrachter Farbstoff, eine hohe Flankensteilheit aufweist, ist eine Verschiebung des Schwerpunkts deutlicher als eine Verschiebung der Mittenfrequenz zu detektieren. Der Nachteil beider Maße ist dennoch die hohe optische Weglänge, welche für eine Verschiebung des Frequenzschwerpunktes benötigt wird. Dem gegenüber steht ein simpler linearer mathematischer Zusammenhang, der sich in einer niedrigen Rechenzeit und einer einfachen Interpretation widerspiegelt.

Ein weiteres Maß zur Visualisierung der spektroskopischen Daten ist durch die Arbeiten von [17] und [16] angeregt worden. Während die Betrachtung der Frequenzschwerpunktsverschiebung am ehesten geeignet erscheint, um Absorptionseigenschaften des Gewebes zu illustrieren, haben diese Studien gezeigt, dass anhand der Modulation des lokalen Frequenzspektrums Aussagen über die Dichte, Größe und Verteilung der Streuzentren im Gewebe getroffen werden können. Messungen von Lösungen mit Mikrosphären, welche einen Durchmesser besaßen, der in etwa der Kohärenzlänge entsprach und bis hinunter zu einigen wenigen hundert Nanometern reichte, zeigen folgenden Einfluss auf die Modulation des Spektrums:

Regionen, die kleine Streuzentren enthalten, die relativ dicht gepackt sind und in ihrer Größe eine höhere Variation aufweisen, erzeugen im Vergleich zu größeren Streuzentren, die weniger dicht gepackt sind und einen homogenen Größenunterschied besitzen, eine größere Modulation. Die Bandbreite der Autokorrelation des lokalen Spektrums stellt sich als zuverlässiger Indikator für diese Modulation heraus. Die Autokorrelation $A_W(m)$ ist gegeben durch:

$$A_W(m) = \sum_k |W_{PR}^{CZT}(k)| |W_{PR}^{CZT}(k - m)|. \quad (4.2.2)$$

Vom Scheitelpunkt aus gesehen fällt der Verlauf dieser achsensymmetrischen Funktion stärker ab und weist zum Rand hin mehr Nebenmaxima auf, wenn die Spektrumsmodulation steigt, so dass sich die Bandbreite dieser Funktion als Maß zur Darstellung spektroskopischer Information eignet. Ein entscheidender Vorteil dieser Metrik ist, dass sie Änderungen des Gewebes, die auf ein unterschiedliches Rückstreuverhalten zurückzuführen sind, im Gegensatz zur Betrachtung des absorptionsbezogenen Frequenzschwerpunktes, sehr lokal berücksichtigen kann.

Dies führt unter anderem dazu, dass dieses Maß unabhängig von Dopplerverschiebungen des Frequenzspektrums ist, so dass Nichtlinearitäten des Referenzarms in erster Näherung vernachlässigt werden können und es keiner Korrektur bedarf. Die gleiche Unempfindlichkeit zeigt dieses Maß gegenüber der mit der Eindringtiefe zunehmenden Rotverschiebung, verursacht durch die Rayleigh-Streuung, und der in Kapitel 3.2.3 diskutierten Dispersion. Nachteilig für den Einsatz dieser Metrik ist die Tatsache, dass die zugrundeliegende Streutheorie nach Mie die Streueigenschaften eines kugelförmigen Streuzentrums und sogar einer Superposition mehrerer Sphäroide zwar exakt beschreibt, doch ist der mathematische Zusammenhang zum Einen relativ komplex und zum Anderen weicht dieser bei zu starken Inhomogenitäten von der tatsächlichen Beschreibung des Gewebes ab. Dies führt in extremen Fällen, wie z.B. großen Missverhältnissen der Größen- und Dichteverteilung, Abweichungen von der Kugelform oder Mehrfachstreuung, dazu, dass die Modulation und somit die Bandbreite der Autokorrelation keinen eindeutigen Rückschluss auf die Zahl, Dichte oder Verteilung der Streuzentren erlaubt. Nichtsdestotrotz werden beide Maße auf ihre Fähigkeit hin untersucht, eine Kontraststeigerung zu erreichen.

Die Darstellung der intensitätsbasierten und spektroskopischen Daten wird mit Hilfe eines *HSV*-Graphen realisiert, in dem jedem Bildpunkt drei Werte (Hue - engl. Farbton, Saturation - engl. Sättigung, Value - engl. Wert bzw. in diesem Kontext Helligkeit) zugeordnet werden können. Der Farbton H , übergeben durch eine Zahl von 0 bis 1, beginnt bei rot und geht über grün, blau, violett wieder in rot über. Die Sättigung S , bestimmt durch eine Zahl von 0 bis 1, verändert den Farbton von grau bis zu seiner vollen Sättigung, während die Helligkeit V , festgelegt durch eine Zahl von 0 bis 1, den Farbton von dunkel bis hell variiert.

Es ist naheliegend, die intensitätsbasierten Daten als Helligkeit des Graphen einzusetzen, wozu zunächst die Einhüllende des Interferenzsignals berechnet, diese dann logarithmiert und auf Eins normiert wird. Der Farbton wird für die Visualisierung des spektroskopischen Maßes, also entweder den Frequenzschwerpunkt oder die Bandbreite

der Autokorrelation genutzt, welches aus den Frequenzdaten berechnet und dann auf Eins normiert wird. Die Sättigung wird üblicherweise auf das Maximum gesetzt oder anhand der Intensitätsdaten erstellt, was dem Bild einen besseren strukturellen Kontrast und lebendigere Farben verleiht.

4.3 Technische Durchführung

Wie aus den mit dem Messrechner erfassten Rohdaten ein Bild generiert wird, soll im Folgenden skizziert werden. Die hierfür nötigen Programme wurden in MatLab programmiert, da es eine reichhaltige Bibliothek an Funktionen und Algorithmen im Bereich der digitalen Nachverarbeitung, wie z.B. diverse FIR-Filter und die Chirp Z-Transformation, besitzt.

Da es zur Zeit noch nicht möglich ist, einzelne A-Scans mit Hilfe der Messeinheit zu erfassen und auf der Festplatte zu speichern, muss ein kompletter B-Scan an einem Stück aufgenommen und geschrieben werden. Die Datenmenge eines einzigen Kanals, der das Interferenzsignal mit einer fünffachen Überabtastung aufnimmt, beträgt bei 150 A-Scans in etwa 40 MB, wenn das Signal in einem binären Datenformat gespeichert wird. Die Datenmenge vervierfacht sich im Speicher, wenn mit einem Programm, z.B. MatLab, ein Messwert als 64 Bit-Zahl (Double Precision) verarbeitet wird. Diese Datenmenge macht deutlich, dass die Nachverarbeitung insbesondere hinsichtlich einer STFT oder sogar Wavelet-Transformation an die Grenzen jedes handelsüblichen Rechner stößt, so dass ein sorgfältiges Datenmanagement nötig ist.

Parallel zum Interferenzsignal (vgl. Abbildung 3.3.4) wird ein Triggersignal, welches durch die Ansteuerplatine zu Beginn eines jeden A-Scans gesendet wird, aufgenommen. Nachdem das Interferenzsignal einen digitalen Bandpass durchlaufen hat, wird es mit Hilfe des Triggers in eine Matrix geschrieben, deren Spalten jeweils die Daten eines A-Scans beinhalten. Den gleichen Formalismus durchläuft auch der zum Interferenzsignal parallele Kanal des HeNe-Lasers. In einer ersten Graustufendarstellung der Intensitätsdaten wird der für die spektroskopische Untersuchung interessante Bereich ausgeschnitten und der Geschwindigkeitskorrektur unter Zuhilfenahme der Daten des HeNe-Signals unterzogen (siehe Abschnitt 3.4.6).

Hier beginnt die eigentliche Berechnung des Bildes. Zum Datensatz eines A-Scans wird die Hilberttransformierte addiert. Das resultierende Signal wird mit einem Hanning-Fenster multipliziert, welches unabhängig von seiner Breite in beliebiger Schrittweite über den Datensatz geschoben werden kann. Nach jeder Multiplikation des Fensters mit dem Signal wird die CZT berechnet, aus deren Amplitude man sowohl einen Wert für den Frequenzschwerpunkt als auch für die Bandbreite der Autokorrelation kalkuliert. Es hat sich in der Auswertung von SOCT-Bilder herausgestellt, dass die Bandbreite bei 70% der Autokorrelation und nicht wie in [17] bei 90% extrahiert werden muss, damit eine Kontraststeigerung erreicht wird. Dies ist vermutlich auf die in der oben genannten Studie höhere Bandbreite von 200 nm zurückzuführen, welche stärkere Modulationen

des Spektrums zulässt, so dass die Autokorrelation stärker in der Breite wie auch in der Anzahl der Nebenmaxima variiert. Deswegen kann und muss die Bandbreite zum Scheitelpunkt hin abgelesen werden. Einen Wert für die Intensität erhält man, indem das mit der Fensterfunktion multiplizierte und gewichtete Signal über die Hilberttransformation demoduliert, die gewichteten Intensitäten aus einem beliebigen Bereich um den Scheitelpunkt des Fensters aufsummiert und mittelt. Dieses Vorgehen hat einen Vorteil gegenüber der Extraktion eines einzelnen Punktes, da es als eindimensionaler Tiefpass wirkt. Um weichere Strukturen im Bild zu erhalten, muss die zu mittelnde Umgebung breiter gewählt werden. Eine gute Flankensteilheit kann gewährleistet werden, wenn die Größe dieser Umgebung der Schrittweite entspricht. Alles in allem wird die Ortsauflösung der Frequenzdaten durch die Fensterbreite bestimmt, während die Ortsauflösung der Intensitätsdaten durch die Schrittweite festgelegt wird. Beide können also unabhängig von einander eingestellt werden, was dazu führt, dass die Ortsauflösung nur in der Frequenzdomäne durch die STFT eingeschränkt ist. Nachdem alle A-Scans in dieser Weise bearbeitet worden sind, erhält man drei Matrizen, welche die Intensitätsdaten, die Frequenzschwerpunkte und die Bandbreiten enthalten. Diese werden jeweils auf Eins normiert, so dass zwei Intensitätsdatenmatrizen wahlweise mit einer der spektroskopischen Matrizen zu einem *HSV*-Graphen zusammengesetzt werden können. Ist das Bild zusammengesetzt, so kann im Nachhinein die Helligkeits- bzw. Farbtionskala zur Kontraststeigerung entsprechend angepasst werden. Die für ein Bild benötigte Rechenzeit bewegt sich je nach Grad der Überabtastung und Anzahl der A-Scans in der Größenordnung einiger Minuten, was nur auf die Auswertung der spektroskopischen Daten zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der *HSV*-Graph die offensichtlichste Form zur gleichzeitigen Visualisierung der intensitätsbasierten und spektroskopischen Informationen darstellt. Letztere werden durch die Auswertung des hochfrequenten Interferenzsignals mittels Short-Time-Fourier-Transformation (STFT) generiert. Auf der Grundlage der Chirp-Z-Transformation kann keine andere zeitaufgelöste Zeit-Frequenz-Transformation die STFT in Bezug auf Schnelligkeit, Verlässlichkeit und Aussagekraft übertreffen [25]. Damit kann ein für die wellenlängenspezifischen Gewebeeigenschaften repräsentatives Maß effizient ermittelt werden. Die Rückstreuung des zu untersuchenden Objekts kann durch die Bandbreite der Autokorrelation ausgedrückt werden [17]. Der Frequenzschwerpunkt ist charakteristisch für das Absorptionsverhalten der Probe. Während dieser aufgrund seiner Einfachheit eindeutig zu interpretieren ist, aber relativ hohe optische Weglängen zur Änderung benötigt, sind Änderungen in der Bandbreite der Autokorrelation sehr lokal detektierbar, was die Anfälligkeit gegenüber Dopplerverschiebungen des Spektrums nahezu ausschaltet. Aufgrund des relativ komplexen mathematischen Zusammenhangs dieses Maßes ist es zum Einen nicht immer eindeutig zu deuten und zum Anderen resultiert daraus eine erhöhte Rechenzeit. Diese beträgt für die Berechnung eines Bildes mehrere Minuten, was für die Grundlagenforschung noch zu tolerieren, aber für die Echtzeitverarbeitung indiskutabel ist. Sind die für eine Kontraststeigerung nötigen Algorithmen ungeachtet dessen ausgearbeitet, so steht einer Implementierung dieser auf ein FPGA nichts im Wege, wodurch die digitale Nachverarbeitung auf wenige Sekundenbruchteile reduziert werden kann.

5 SOCT-Messungen

Zuerst wird die Justage des SOCT-Interferometers überprüft und das für die Probe zur Verfügung stehende Spektrum bestimmt. Danach soll die Untersuchung eines Absorptionsfilters das Vermögen des SOCT-Systems messen, spektrale Information qualitativ und quantitativ wiederzugeben. Es folgt eine Charakterisierung des eingesetzten NIR-Farbstoffes, welcher daraufhin in ein homogenes auf Agarose basierendes Gel eingebettet wird. Im Gel wird der Farbstoff auf seine Fähigkeit hin untersucht, eine Kontraststeigerung in einer leicht streuenden Umgebung zu erzeugen. Des Weiteren wird der Einsatz des Chromophores an einem pflanzlichen Präparat, der Blattader eines Holunderblattes, und einem auf Zellkulturen beruhenden Gewebemodell erprobt.

5.1 Autokorrelation

Die folgende Messung der Autokorrelation dient der Überprüfung der Justage der Linse im Probenarm und der Bestimmung des für die Probe zur Verfügung stehenden Spektrums bzw. der spektralen Leistungsdichte. Dazu wird ein Silberspiegel in den Fokus des Probenarms positioniert. Die LSF (Line Spread Function – vgl. Abschnitt 3.4.1) wird über die volle Breite der Probenarmlinse gemessen und als OCT-Tomogramm dargestellt. Die zur Verfügung stehende spektrale Leistungsdichte kann aus der Autokorrelation des Interferometers berechnet werden (vgl. Gleichung ??). Hierfür wurden alle A-Scans der LSF gemittelt und mit Hilfe der CZT fouriertransformiert. Unter Zuhilfenahme des eindeutigen Zusammenhangs zwischen optischer Wellenlänge und elektronischer Trägerfrequenz konnte daraus die wellenlängenabhängige Leistungsdichte ermittelt werden. Diese wird dann mit dem Spektrum des Ti:Saphir-Lasers verglichen, welches zuvor mit dem optischen Spektrum-Analysator *ANDO A-6315A* bestimmt wird.

In Abbildung 5.1.1(a) ist das OCT-Tomogramm des Silberspiegels zu sehen. Die Oberfläche des Silberspiegels ist durch die weiße Gerade bei einer Tiefe von etwa 450 μm zu erkennen. Es ist klar ersichtlich, dass die Linse im Probenarm optimal justiert ist, da die horizontale Spiegeloberfläche als Gerade in dem Tomogramm abgebildet wird (vgl. Abschnitt 3.4.1). Die zur horizontalen Achse des Spiegels symmetrischen, schwachen Streifen im oberen und unteren Teil des Bildes sind auffällig. Sie erscheinen erfahrungsgemäß bei stark reflektierenden Proben, wie z.B. Gläsern oder Wasserfilmen auf biologischen Proben. Da diese Linien nicht auf die Struktur der Probe – sprich des Silberspiegels – zurückgeführt werden können, ist die Ursache nur bei den optischen Komponenten des Interferometers zu suchen. Solche Phänomene werden normalerweise mit Vielfachreflexionen in einem optischen Aufbau in Verbindung gebracht. Ein Abstand von mehreren

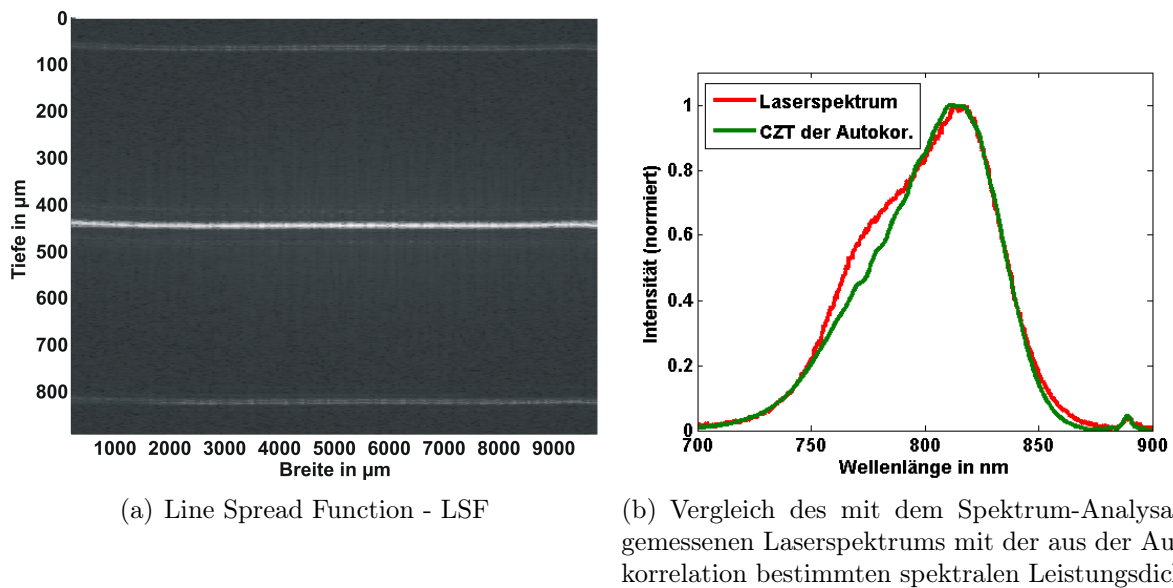


Abbildung 5.1.1: **Im Interferometer gemessene LSF und spektrale Leistungsdichte**

hundert Mikrometern der Streifen vom Spiegel deutet darauf hin, dass die im Interferometer verwendeten Strahlteiler Auslöser dieser Nebenmaxima sind. Die Glassubstrate, aus denen die Strahlteiler gefertigt sind, besitzen wie auch die Linsen eine vom Hersteller angegebene Ungenauigkeit von 0,2 mm. Diese entspricht genau der Größenordnung der Distanz der Abbildungsfehler vom Silberspiegel.

In Abbildung 5.1.1(b) ist der Vergleich zwischen der mit dem optischen Spektrum-Analysator gemessenen und der aus dem Interferenzsignal der Spiegeloberfläche extrahierten spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle als Funktion der Wellenlänge dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Bandbreite im Interferometer um wenige Prozent abgenommen hat. Da die Strahlteiler, wie in Abschnitt 3.2.2 schon erwähnt, weitaus höhere Bandbreiten unterstützen, ist im Wesentlichen nur der analoge Bandpass als Ursache für diese Reduktion aufzuführen.

Hier muss darauf geachtet werden, dass die Mittenfrequenz des Bandpasses immer über der Trägerfrequenz des elektronischen, dopplerverschobenen Spektrums liegt, so dass die steilen Flanken des Filters die Bandbreite des Spektrums nicht einschränken. Das gilt insbesondere für die Seite des Spektrums, die von der Gaußform abweicht. Leichte durch Temperaturschwankungen bedingte Variationen in der Ansteuerspannung können zu einer Verschiebung der Dopplergeschwindigkeit des Piezoaktors führen und verursachen eine solchen Einschränkung. Nichtsdestotrotz ist eine optische Bandbreite von 80 nm im Interferometer verfügbar, wenn die Trägerfrequenz regelmäßig kontrolliert oder aber die elektronische Bandbreite erhöht wird (vgl. Abschnitt 3.3.2). Obwohl die volle Bandbreite für eine Kontraststeigerung angestrebt wird, zeigt eine Einschränkung dieser vielmehr die untere Grenze der in der SOCT zu einer Steigerung des spektroskopischen Kontrastes benötigten Bandbreite.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die Justage der Probenarmlinse nur einmal durchgeführt werden muss (vgl. Abschnitt 3.4.1), während eine sorgfältige elektronische Justage des SOCT-Systems nötig ist, um die volle Bandbreite der Lichtquelle für die Messung zur Verfügung zu stellen.

5.2 Absorptionsfilter RG850

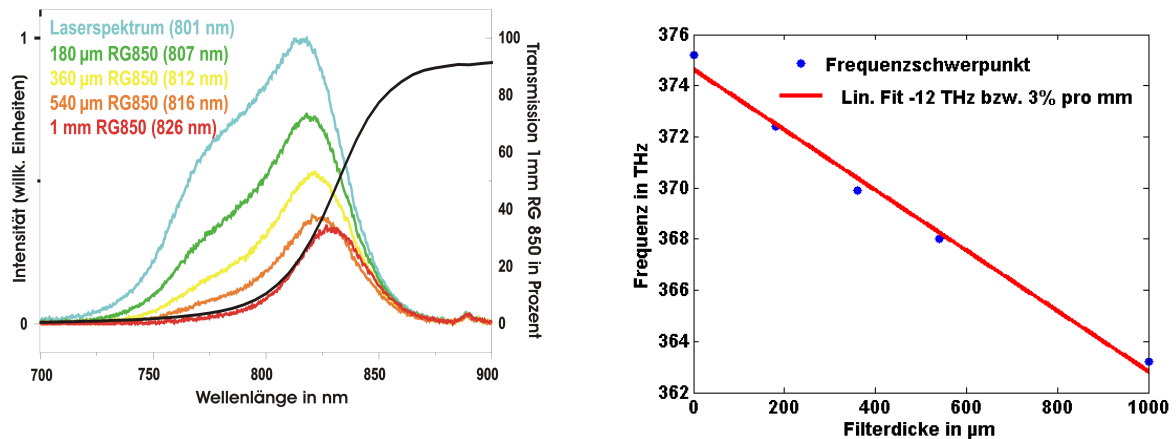
Im Hinblick auf den Einsatz von NIR-Farbstoffen in der spektroskopischen OCT, welche durch ihr charakteristisches Absorptionsverhalten eine Verschiebung des Frequenzschwerpunktes des Laserspektrums im Gewebe verursachen, wurde als einfachste denkbare Probe ein Absorptionsfilter (RG850) der Firma *Schott* verwendet.

Um das statische Absorptionsverhalten des Filters zu charakterisieren, wurde als erstes das Transmissionsverhalten eines 1 mm dicken Filters mit Hilfe des Photospektrometers *AVIV-17DS* aufgenommen. Das Ergebnis dieser Messung kann in Abbildung 5.2.1(a) betrachtet werden.

Das wellenlängenabhängige Transmissionsverhalten des Filters wird durch die schwarze Kurve dargestellt (rechte y -Achse). Der Filter zeichnet sich durch eine steile wellenlängenabhängige Absorptionskante aus, die das obere Drittel des Wellenlängenbereichs des Ti:Saphir-Laserspektrums transmittiert, so dass eine relativ hohe Verschiebung der Schwerpunktsfrequenz bei der Transmission zu erwarten ist.

Um die erwartete Verschiebung des Laserspektrums zu quantifizieren, wurde im nächsten Schritt mit einer Poliermaschine aus dem 1 mm dicken Filter mehrere kleine Filter mit einer Dicke von etwa 180 μm gefertigt. Diese wurden dann in steigender Anzahl zwischen den optischen Spektrum-Analysator und den Ti:Saphir-Laser positioniert, so dass eine wellenlängenabhängige Abschwächung der spektralen Leistungsdichte in Abhängigkeit der Dicke des Absorptionsfilters gemessen werden konnte. Das Ergebnis dieser Messung ist ebenfalls in Abbildung 5.2.1(a) dargestellt.

Die farbigen Kurven zeigen die wellenlängenabhängige spektrale Leistungsdichte des transmittierten Laserspektrums (linke y -Achse). Die Kurven sind auf das Spektrum des unabgeschwächten Ti:Saphir-Lasers normiert. Entsprechend der Transmission des Filters wird der kurzwellige Anteil des Laserspektrums stärker abgeschwächt als der langwellige Anteil. Die Dämpfung des kurzwelligen Spektrums verstärkt sich mit zunehmender Filterdicke und führt zu einer Verschiebung der Zentralwellenlänge. Die eingeklammerten Zahlen in der Legende quantifizieren die Verschiebung des Wellenlängenschwerpunkts. Dieser berechnet sich in Analogie zum Frequenzschwerpunkt (vgl. Gleichung 4.2.1). Betrachtet man die Verschiebung der Maxima bzw. Zentralwellenlänge der abgeschwächten Spektren, so wird deutlich, dass der Schwerpunkt dem Maximum als Maß der Verschiebung zu bevorzugen ist. Der Schwerpunkt weist eine Verschiebung von 25 nm nach einer durchdrungenen Filterdicke von 1 mm auf, während das Maximum nach der gleichen Distanz um weniger als 10 nm verschoben ist.



(a) Wellenlängenabhängige spektrale Leistungsdichte in Abhängigkeit der Schichtdicke des Filters und Transmissionsverhalten des Filters

(b) Aus (a) berechneter Frequenzschwerpunkt in Abhängigkeit der Schichtdicke des Filters

Abbildung 5.2.1: **Mit dem Spektrometer gemessene Verschiebung der spektralen Leistungsdichte und des Frequenzschwerpunktes für verschiedene Dicken des Absorptionsfilters RG850**

Da die Transformation des Interferenzsignals durch die CZT-basierte STFT in den Frequenzraum erfolgt (vgl. Abschnitt 4.1), wird die Verschiebung des Wellenlängenschwerpunkts aus Abbildung 5.2.1(a) in eine Verschiebung des Frequenzschwerpunkts umgerechnet und in Abbildung 5.2.1(b) als Funktion der Filterdicke dargestellt.

Die Verschiebung nimmt nahezu linear mit der Filterdicke ab. Damit ein einfacher Transfer zur SOCT-Messung möglich ist, wurde eine Gerade mittels linearer Regression an die Punkte gelegt, deren Steigung die mittlere Verschiebung pro Filterdicke bzw. Eindringtiefe angibt. Aufgrund des linearen Zusammenhangs von optischer Laserfrequenz und elektronischer Detektionsfrequenz ist eine prozentuale Angabe der Frequenzverschiebung zum Vergleich sinnvoll. Ferner ist dieser prozentuale Verschiebungsmaßstab eingeführt worden, um Frequenzverschiebungen der Spektren bei unterschiedlichen Trägerfrequenzen vergleichen zu können, da Bandpässe mit unterschiedlichen Mittenfrequenzen und Dämpfungen getestet wurden. Aus der Steigung der Geraden kann eine Verschiebung von 3% pro Millimeter durchdrungenen Materials abgelesen werden. Die erwartete Verschiebung liegt damit außerhalb des einprozentigen Detektionsrauschens (vgl. Abschnitt 3.4.6).

Um das SOCT-System auf die Reproduzierbarkeit der in den vorherigen Versuchen gemessenen Frequenzverschiebung zu prüfen, wurden für die folgende Messung die vier oben verwendeten, 180 μm dünnen FarbfILTERplättchen übereinander auf einen Silberspiegel gelegt und in den Fokus des Probenarms positioniert. Eine Skizze dieser Anordnung ist in Abbildung 5.2.5 dargestellt. 200 nebeneinander liegende A-Scans wurden mit der niedrigsten Schrittweite (2,6 μm) aufgenommen, nachbearbeitet und als Tomogramm dargestellt. Die laterale Überabtastung und die unterschiedliche Skalierung der Achsen in den folgenden Abbildungen spielen aufgrund der Symmetrie der Probe keine Rolle. Das Interferenzsignal wurde mit 1,5 MHz abgetastet, was bei einer Mittenfrequenz von 385 kHz einer vierfachen Überabtastung entspricht.

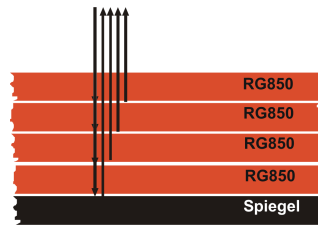
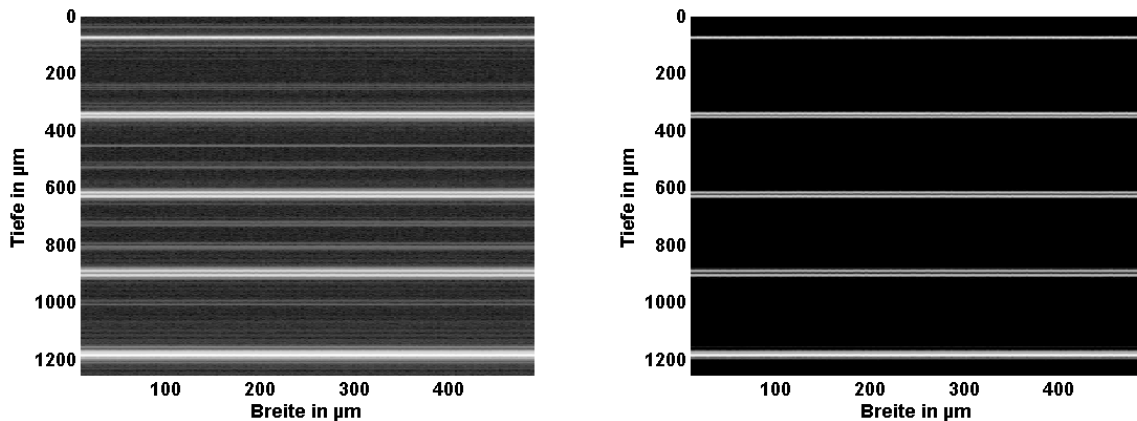


Abbildung 5.2.2: Schematische Darstellung des Probenaufbaus – Vier 180 μm dicke RG850 Absorptionsfilter auf einem Silberspiegel



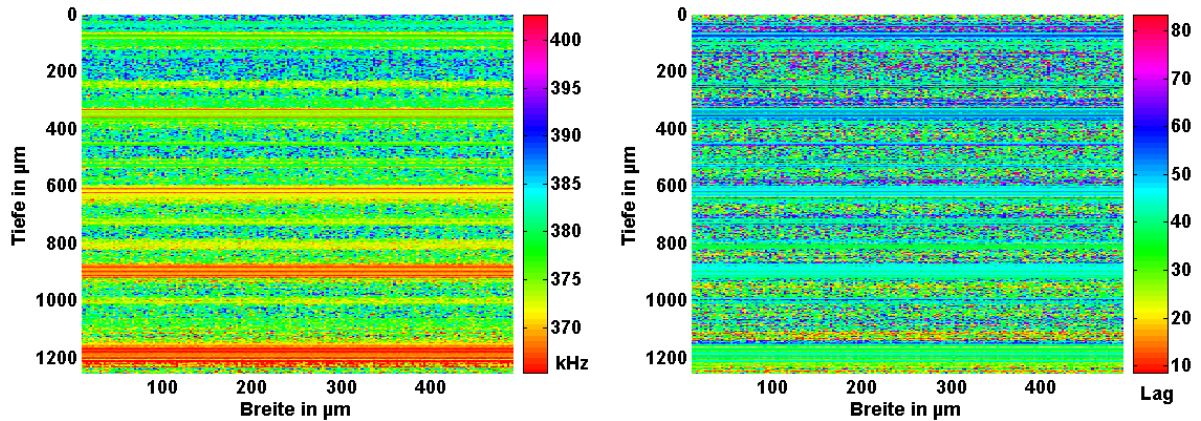
(a) Tomogramm der vier FarbfILTER mit allen Reflexen (b) Graph (a) mit angepasster Graustufenskala

Abbildung 5.2.3: Vier 180 μm dicke RG850 Absorptionsfilter auf einem Silberspiegel - Klassisches OCT-Schnittbild bzw. *V*- und *S*-Graph in der SOCT

In Abbildung 5.2.3(a) ist das OCT-Tomogramm der Farbfilterplättchen in einer Graustufendarstellung (V - bzw. S -Graph in der SOCT) zu sehen. Die Luft-Filter Übergänge sind durch die horizontalen, weißen Geraden in einer Tiefe von $80\ \mu\text{m}$, $350\ \mu\text{m}$, $600\ \mu\text{m}$, $900\ \mu\text{m}$ und $1200\ \mu\text{m}$ klar zu erkennen. Selbst der kleine Luftspalt zwischen zwei aufeinander liegenden Farbfiltern ist zu sehen. Erwartungsgemäß nimmt die reflektierte Intensität mit der Tiefe ab, was ansatzweise an der abnehmenden Helligkeit der Doppelgeraden zu erkennen ist. Die unterste Gerade geht ungeachtet dessen als hellster Reflex hervor, was auf die im Vergleich zu den Filtergrenzflächen höhere Reflektivität des Silberspiegels zurückzuführen ist. Erst in der quantitativen Betrachtung der zurückgestreuten Intensität wird dieses Verhalten deutlich (vgl. später Abb. 5.2.6(a)).

Die Linien, die eine vermeintliche Struktur innerhalb der Farbfilter vermuten lassen, resultieren von dem bereits diskutierten durch die Strahlteiler verursachten Abbildungsfehler (vgl. Abschnitt 5.1). Eine Anpassung der Graustufenskala führt zur Unterdrückung dieser Signalbeiträge und so zur Darstellung der tatsächlichen Struktur. Diese ist in Abbildung 5.2.3(b) wiedergegeben.

Es fällt auf, dass der auf der Abszisse aufgetragene Maßstab von den mit einer Schieblehre vermessenen Dimensionen der Absorptionsfilter abweicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Skala die gemessene Tiefe in Luft angibt. Berücksichtigt man die gemessenen $180\ \mu\text{m}$ eines Filters und vergleicht diesen Wert mit der Tiefe aus dem Bildmaßstab, so lässt sich ein Brechungsindex von 1,56 für den Filter in Übereinstimmung mit den Angaben des Herstellers berechnen. Die Genauigkeit der Messung ist hierbei durch die Meßgenauigkeit der Schieblehre beschränkt.



(a) Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Schwerpunktsfrequenz (b) Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Bandbreite der Autokorrelation

Abbildung 5.2.4: Vier 180 µm dicke RG850 Absorptionsfilter auf einem Silberspiegel - Spektroskopisches Maß als H -Graph in der SOCT

Zur spektroskopischen Auswertung dieser Messung an den Farbfilternschichten sind in Abbildung 5.2.4 die in Abschnitt 4.2 eingeführten spektroskopischen Metriken in Tomogrammen (H -Graphen in der SOCT) mit einer Farbskala präsentiert. Für die Frequenzanalyse war die Breite des Hanning-Fensters in der CZT von 340 bis 430 kHz 128 Punkte (12,5 µm in Luft). Das Fenster wurde in Schritten von 1,8 µm (18 Punkten) mit dem Signal multipliziert.

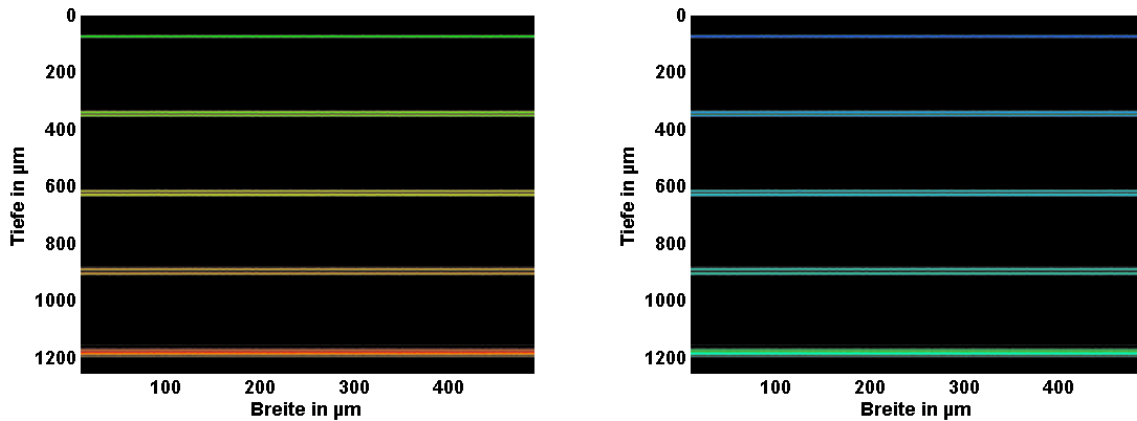
In 5.2.4(a) ist der Frequenzschwerpunkt als Farbton ortsabhängig dargestellt. Die Luft-Filter-Übergänge sind in dem Tomogramm durch die horizontalen grünen, gelben und orangen-roten Geraden in einer Tiefe von 80 µm, 350 µm, 600 µm, 900 µm und 1200 µm deutlich zu erkennen. Die erwartete Verschiebung des Frequenzschwerpunktes zu niedrigeren Frequenzen ist eindeutig am Übergang eines grünen Farbtons des Eintrittsignals bei einer Tiefe von etwa 80 µm zu einem roten Farbton des Spiegelsignals bei einer Tiefe von ca. 1,2 mm zu erkennen. Selbst der Hintergrund, am besten zu erkennen in der Tiefe von etwa 100 µm bis 220 µm im Zwischenraum des ersten Filters, erfährt mit der Tiefe durch die Absorption der Filter eine Rotverschiebung. Dieser liegt, wie durch das Frequenzintervall der CZT (340 kHz-430 kHz) festgelegt, in der Mitte dieser Spanne um 385 kHz. Die Schwerpunktsfrequenz des Laserspektrums liegt bei 378 kHz. Da eine Rotverschiebung von vornherein zu erwarten war, wurde das Farbtonspektrum auf die zu erwartende Rotverschiebung normiert, so dass der Hintergrund einen leichten Blaustich aufweist.

Auffällig sind die zum Roten verschobenen Linien oberhalb eines jeden Brechungsindexsprungs. Diese werden immer in den oberen und unteren Randbereichen eines SOCT HSV -Graphen deutlich, wo die Dispersion nicht mehr ausgeglichen ist. Sie sind verstärkt zu beobachten, wenn die Dispersion nicht auf die Probe optimiert worden ist (vgl. Abschnitt 3.2.3). Der durch die Dispersion entstandene Chirp der Autokorrelation ist also nicht nur im Zeitbereich, sondern auch im Frequenzbereich sichtbar. Ferner werden auch

hier die Abbildungsfehler in den Zwischenräumen der Filter deutlich.

In 5.2.4(b) ist die Bandbreite der Autokorrelation als Farbton ortsabhängig dargestellt. Die Grenzflächen der Filter sind in dem Tomogramm durch die horizontalen blauen bis türkisen Geraden in einer Tiefe von $80\ \mu\text{m}$, $350\ \mu\text{m}$, $600\ \mu\text{m}$, $900\ \mu\text{m}$ und $1200\ \mu\text{m}$ zu erkennen. Es ist zu erkennen, dass sich die Bandbreite vom Brechungsindexsprung des obersten Filters ($\text{Lag} \approx 65$) kontinuierlich bis zum Spiegel ($\text{Lag} \approx 30$) halbiert.

Die Bandbreitenreduktion ist auf den absorptionsbedingten Verlust der optischen Bandbreite zurückzuführen. Das schränkt die Stärke der potentiellen Spektrumsmodulation und somit die Bandbreite der Autokorrelation ein. Da in der Studie, in der diese Messgröße ursprünglich eingeführt wurde [17], eine Bandbreite von $200\ \text{nm}$ zur Verfügung stand, fiel der Verlust der optischen Bandbreite durch Absorption nicht so stark ins Gewicht wie bei der hier verwendeten optischen Bandbreite von $80\ \text{nm}$. Konsequenterweise bedeutet das, dass dieses Maß sowohl die Streuung als auch im extremen Fall die Absorption berücksichtigt. Dadurch ist eine sorgfältige Interpretation dieser spektroskopischen Metrik erforderlich.



(a) Ortsaufgelöste Schwerpunktsfrequenz als spektroskopische Metrik

(b) Ortsaufgelöste Bandbreite der Autokorrelation als spektroskopische Metrik

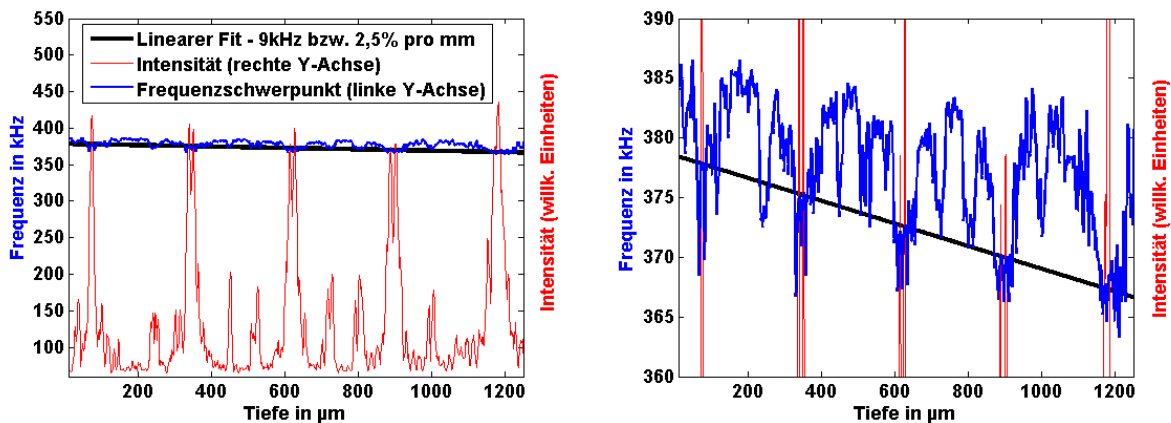
Abbildung 5.2.5: **Vier $180\ \mu\text{m}$ dicke RG850 Absorptionsfilter auf einem Silberspiegel - HSV-Graph in der SOCT**

Die soeben diskutierten Graphen 5.2.3(b) und 5.2.4 sind zu HSV-Graphen zusammengesetzt in Abbildung 5.2.5 dargestellt. Die Grenzflächen der Filter und des Spiegels werden klar durch die waagerechten, farbigen Geraden in beiden Tomogrammen dargestellt. Am Farbwechsel der Brechungsindexsprünge kann der soeben diskutierte absorptionsbedingte und wellenlängenabhängige Einfluss des Filters auf das Spektrum des zurückgestreuten Lichtes nachvollzogen werden. Bei gleicher Versuchsanordnung, in der jedoch die Filter durch herkömmliche Deckgläser ersetzt sind, ist der Farbton aller Brechungsindexsprünge gleich. Damit ist gezeigt, dass im Vergleich zur OCT in der SOCT durch die spektroskopische Auswertung des Interferenzsignals zusätzliche Informationen über die Probe ortsaufgelöst dargestellt werden können.

Für eine Quantifizierung der Frequenzverschiebung sind jeweils die Intensitäts- und Frequenzdaten über die 200 aufgenommenen A-Scans aus Abbildung 5.2.3(a) (zurückgestreute bzw. reflektierte Intensität) und Abbildung 5.2.4(a) (Frequenzschwerpunkt) gemittelt und in Abbildung 5.2.6(a) und (b) gegen die Eindringtiefe aufgetragen worden. Abbildung 5.2.6(b) stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus 5.2.6(a) dar. An beiden Graphen können die vorherigen Aussagen bezogen auf die Intensität und die Verschiebung des Schwerpunkts qualitativ und quantitativ nachvollzogen werden.

Die mittlere Intensität dient der Orientierung und genauen Bestimmung der Verschiebung der Schwerpunktsfrequenz am Ort des jeweiligen Brechungsindexsprunges. Mit Hilfe der Intensitätsmaxima können die dazu gehörigen Frequenzschwerpunkte lokalisiert und quantifiziert werden. Die Luft-Filter-Übergänge heben sich klar als lokale Intensitätsmaxima bzw. Frequenzschwerpunktsminima in den Graphen vom Hintergrund ab. Hier ist eine Rotverschiebung von Minimum zu Minimum mit zunehmender Tiefe quantitativ nachvollziehbar. Der Hintergrund bei 385 kHz ist deutlich in den Zwischenräumen der aufeinander liegenden Farbfilterplättchen zu erkennen. Er erfährt ebenfalls eine mit der Tiefe zunehmende Rotverschiebung.

Wird eine Gerade mittels linearer Regression an die Frequenzschwerpunkte der Farbfiltergrenzflächen gelegt, so erhält man aus der Steigung eine Verschiebung des Frequenzschwerpunktes von 2,5% pro Millimeter Eindringtiefe. Das Ergebnis stimmt gut mit dem erwarteten Wert von 3% pro Millimeter überein (vgl. Abb. 5.2.1(b)). Die Diskrepanz zur Messung des filterdickenabhängigen Transmissionsverhaltens kann mit der durch den analogen Filter eingeschränkten Bandbreite erklärt werden.



(a) Mittlere Intensität und mittlerer Frequenzschwerpunkt

(b) Vergrößerung von (a)

Abbildung 5.2.6: Über 200 A-Scans gemittelte Daten der Intensität (rot) aus Abb. 5.2.3(a) und des Frequenzschwerpunkts (blau) aus Abb. 5.2.4(a) in Abhängigkeit der Eindringtiefe

Dieses Resultat zeigt, dass das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute SOCT-System spektroskopische Informationen nicht nur qualitativ (in einem *HSV*-Graphen), sondern auch quantitativ orts aufgelöst darstellen kann.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Frequenzverschiebung durch Schwankungen der Referenzspiegelgeschwindigkeit ausgelöst worden ist, wurde mit Hilfe einer Poliermaschine ein Keil aus dem Absorptionsfilter hergestellt und auf einem Silberspiegel vermessen. Durch die Neigung des Keils wird in Abhängigkeit der lateralen Position des A-Scans ein Interferenzsignal der Keiloberfläche für unterschiedliche Referenzarmpositionen generiert. Eine Nichtlinearität des Referenzarms hätte also eine Frequenzverschiebung des von der Oberfläche des Keils zurückgestreuten Interferenzsignals in Abhängigkeit der lateralen Ausdehnung zur Folge. Eine Skizze dieser Anordnung kann in Abbildung 5.2.7 betrachtet werden.



Abbildung 5.2.7: **Schematische Darstellung des Probenaufbaus – Keil aus dem Glas des Absorptionsfilter RG850 auf einem Silberspiegel**

In Abbildung 5.2.8 ist das dazu gehörige SOCT-Tomogramm dargestellt. Hierfür wurde der Frequenzschwerpunkt als farbtongebender Graph mit dem OCT-Tomogramm überlagert. Die für diese Messung und Frequenzanalyse verwendeten Parameter sind der vorherigen Versuchsbeschreibung zu entnehmen. Die Oberkante des Keils ist durch die hauptsächlich blau angefärbte und schräg verlaufende Gerade dargestellt. Die Unterkante des Keils und die Oberfläche des Spiegels sind durch die unteren, parallel verlaufenden Geraden gekennzeichnet.

Betrachtet man die Neigung des unteren Doppelreflexes, so meint man, dass der Keil und der Spiegel zwar parallel zueinander aber nicht horizontal positioniert worden sind. Da die Position aus einer Laufzeitdifferenz ermittelt wird, werden eigentlich nur relative Positionsangaben abgebildet, so dass es bei größeren Unterschieden in der optischen Weglänge zu einer vermeintlichen Streckung des abgebildeten Objektes kommt. Dieser Effekt tritt im Allgemeinen nicht bei biologischen Geweben auf, da die Unterschiede in der optischen Weglänge sehr viel kleiner und gleichmäßiger über den Querschnitt der Probe verteilt sind.

Eine eindeutige Frequenzverschiebung zwischen Ober- und Unterseite des Keils kann mit Hilfe der Farbskala festgestellt werden. Während die Oberkantenreflexion über die gesamte Breite die Tönung nicht verändert, zeigt der Wechsel der Farben mit zunehmender Breite und abnehmender Dicke des Keils im unteren Doppelreflex die bereits erwartete Frequenzverschiebung. Es ist zudem ein Chirp in den Reflexionen zu sehen, welcher verschwindet, wenn die Breite des Hanning-Fensters in der STFT einen gewissen Wert überschreitet.

Eine genaue, hier nicht aufgeführte Quantifizierung zeigt eine zum ersten Experiment analoge tiefenabhängige Verschiebung des Frequenzschwerpunktes. Damit ist die Linearität der Verzögerungsstrecke gezeigt und vor allem die Funktionalität des SOCT-Systems bewiesen.

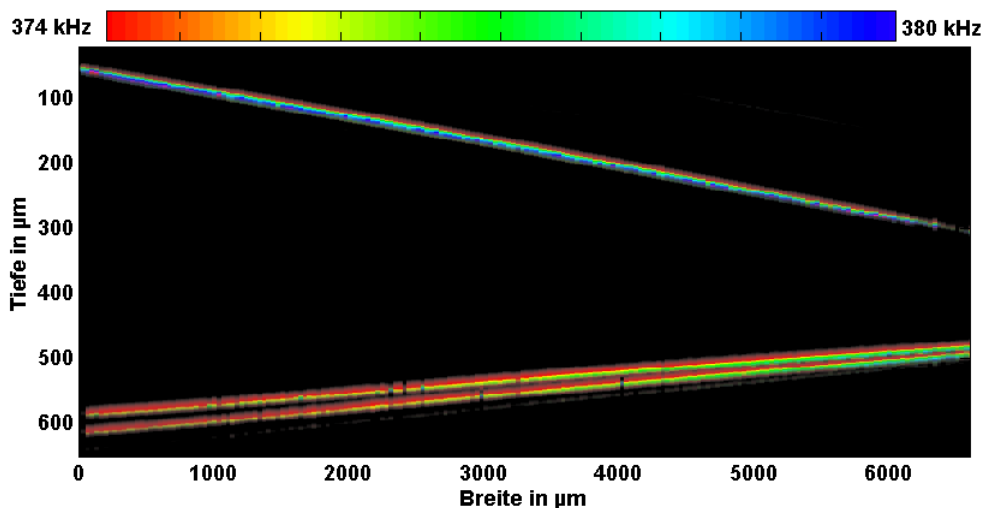


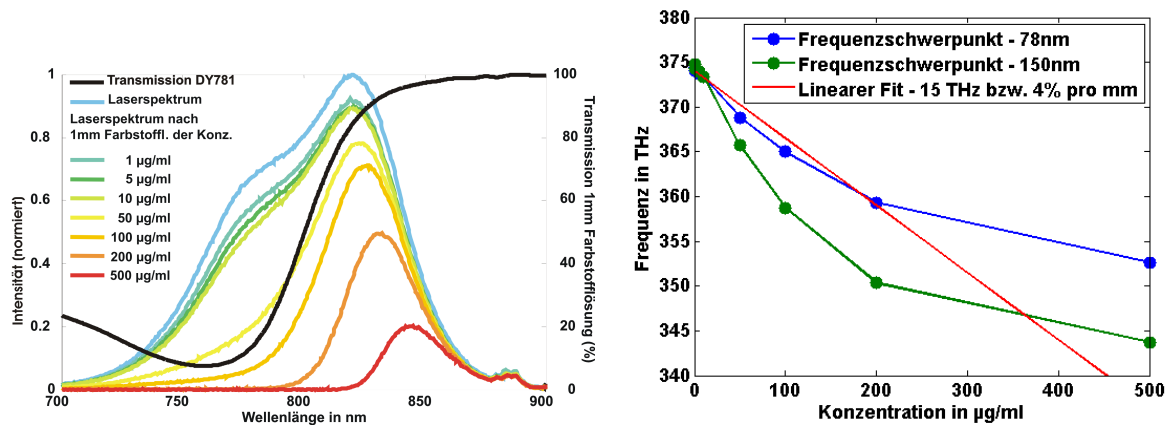
Abbildung 5.2.8: SOCT-Tomogramm eines Keils aus dem Glas des Absorptionsfilter RG850 auf einem Silberspiegel

In diesem Versuch wurde gezeigt, dass das in dieser Arbeit realisierte SOCT-System spektroskopische Informationen über eine Probe sowohl qualitativ als auch quantitativ orts aufgelöst darstellen kann. Diese können in der gezeigten Art und Weise dazu genutzt werden, den Kontrast in der Abbildung einer Probe zu steigern. Bei der Darstellung der spektroskopischen Daten wurde deutlich, dass die Absorption nicht nur den Frequenzschwerpunkt, sondern auch die Bandbreite der Autokorrelation der spektralen Leistungsdichte beeinflusst. Das verlangt eine vorsichtige Interpretation dieses spektroskopischen Maßes. Ferner wurde gezeigt, dass selbst kleine Frequenzverschiebungen nahe der Detektionsgrenze ausreichen, um eine Steigerung des spektroskopischen Kontrastes zu erzielen. Nichtlinearitäten in der Bewegung des Referenzspiegels können als Fehlerquelle in der Frequenzanalyse ausgeschlossen werden, was den betriebenen Aufwand bei der experimentellen Realisierung der linearen Verzögerungseinheit rechtfertigt (vgl. Abschnitt 3.4.6). Somit wird eine Kontraststeigerung durch eine spektroskopische Analyse selbst bei kleinsten optischen Bandbreiten ermöglicht (vgl. [4]).

5.3 Farbstoff DY-781 und Agarosegel

Nachdem die Fähigkeit des SOCT-Systems gezeigt worden ist, spektrale Informationen qualitativ und quantitativ orts aufgelöst darzustellen, wurde im nächsten Schritt das Kontraststeigerungspotential eines NIR-Farbstoffes getestet. Dabei wurde der Farbstoff DY-781 der Firma *Dyomics* eingesetzt, der ähnliche Absorptionseigenschaften wie der Farbfilter besitzt. Eine steile Absorptionskante in der Nähe der Zentralwellenlänge der Lichtquelle lässt eine hohe absorptionsbedingte Frequenzverschiebung des Laserspektrums erwarten. Weiterhin zeichnet sich dieses Chromophor durch seine Eigenschaft aus, sich mit verschiedenen Lösungsmitteln zu vermischen. Neben der Löslichkeit in Wasser ist eine Vermischung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) hinsichtlich der Anfärbung von biologischem Gewebe möglich. Dieses organische Lösungsmittel besitzt die Fähigkeit die Permeabilität von Zellwänden zu erhöhen. Außerdem besteht die Möglichkeit, diesen Farbstoff antikörpergebunden einzusetzen. Damit könnten biologische Präparate gewebespezifisch angefärbt werden.

In Analogie zum Absorptionsfilter wurden zunächst die statischen wellenlängenabhängigen Transmissionseigenschaften des Farbstoffes mit Hilfe des Photospektrometers charakterisiert. Anschließend wurde die zu erwartende absorptionsinduzierte Verschiebung des Frequenzschwerpunktes des Ti:Saphir-Lasers über seine konzentrationsabhängige Transmission des Laserspektrums durch eine Farbstofflösung bestimmt. Zu diesem Zweck wurde 1 mg des Farbstoffes in 1 ml DMSO gelöst und in verschiedenen Verdünnungsstufen mit destilliertem Wasser in eine 1 mm dicke Küvette gegeben und darin vermessen.



(a) Wellenlängenabhängige spektrale Leistungsdichte in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration und Transmissionsverhalten des Farbstoffes

(b) Frequenzschwerpunkt in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für zwei Bandbreiten bei 800 nm

Abbildung 5.3.1: Mit dem Spektrometer gemessene Verschiebung der spektralen Leistungsdichte und des Frequenzschwerpunktes für den Farbstoff DY781

Die schwarze Kurve in Abbildung 5.3.1(a) zeigt das wellenlängenabhängige Transmissionsverhalten des Farbstoffes bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$. Es wird deutlich, dass die Transmissionskante das Spektrum der OCT-Lichtquelle nahe der Zentralwellenlänge von 800 nm schneidet, so dass ein guter Kompromiss zwischen Schwerpunktsverschiebung und absorptionsbedingtem Intensitätsverlust erreicht werden kann. Die farbigen Kurven zeigen die spektralen Leistungsdichten des durch diese Farbstofflösung transmittierten Laserspektrums für verschiedene Konzentrationen des Farbstoffes als Funktion der Wellenlänge. Man sieht deutlich, dass entsprechend des Absorptionsverhaltens des Farbstoffes der kurzwellige Anteil des Laserspektrums stärker abgeschwächt wird als der langwellige Anteil. Mit zunehmender Farbstoffkonzentration verstärkt sich diese Dämpfung und führt zu einer Abnahme der Gesamtintensität und einer Verschiebung der Zentralwellenlänge bzw. des Wellenlängenschwerpunkts.

In Abbildung 5.3.1(b) ist die aus (a) berechnete konzentrationsabhängige Verschiebung des Frequenzschwerpunktes (blaue Kurve) aufgetragen. Nachdem der Frequenzschwerpunkt bis zu einer Konzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ nahezu linear abfällt, flacht die Verschiebung des Schwerpunkts oberhalb dieser Konzentration ab. Aus dem Vergleich von 5.3.1(a) und (b) folgt, dass eine Farbstoffkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ für die SOCT geeignet erscheint, da sie einen guten Kompromiss zwischen Schwerpunktsverschiebung und Intensitätsverlust darstellt. Die rote Gerade in 5.3.1(b) ist in Analogie zum vorherigen Versuch (vgl. Abschnitt 5.2) gezogen worden und hilft bei der Quantifizierung des erwarteten Effekts. Aus dem Lambert-Beer'schen-Gesetz geht hervor, dass die in einem Material absorbierte Intensität bei einer Vervielfachung der Farbstoffkonzentration konstant bleibt, wenn der von dem Lichtstrahl zurückgelegte optische Weg um den gleichen Faktor reduziert wird. Diese Tatsache erlaubt eine weglängenabhängige Interpretation der Kurve und der Geraden in diesem Graphen. Die Steigung der Geraden lässt eine Verschiebung von 4% pro Millimeter durchdrungener Farbstofflösung erwarten, wenn die Konzentration des homogen verteilten Farbstoffes $200 \mu\text{g/ml}$ beträgt.

Bei der Messung des Laserspektrums nach der Transmission durch die Farbstofflösung ist aufgefallen, dass der Farbstoff bei zu hohen Laserintensitäten ausbleicht und seine Absorptionseigenschaften verliert. Dies äußert sich dadurch, dass die durch den Farbstoff reduzierte Bandbreite mit der Zeit wieder zunimmt. Die wellenlängenabhängige Absorption wird durch die Elektronenverteilung der äußeren Bindungselektronen des Farbstoffmoleküls bestimmt, welche sich durch das Anhängen von funktionellen Gruppen an das Farbstoffmolekül, wie z.B. Amino- oder Methylgruppen, zu kürzeren oder längeren Wellenlängen verschieben lässt. Übersteigt die von den Elektronen aufgenommene Lichtintensität einen kritischen Wert, so können die Elektronen die Energie nicht mehr schnell genug abgeben, so dass dies zur Spaltung einiger Bindungen des Moleküls führt. Dadurch verliert es seine Absorptionseigenschaften in diesem Wellenlängenbereich bzw. werden diese in einen anderen Bereich verlagert. Bei der Messung mit dem Spektrometer konnte dieser Effekt durch Abschwächung der Eingangsintensität mit Hilfe von Neutraleichtfiltern ausgeschaltet werden. Obwohl dies ein aus der Fluoreszenz-Mikroskopie bekanntes Phänomen ist, muss noch genauer untersucht werden, was für eine Rolle das Ausbleichen des hier eingesetzten Farbstoffes in den folgenden Experimenten spielt. Studien über andere Farbstoffe sind in diesem Zusammenhang schon unternommen worden

und können als Ausgangsbasis dienen [26].

Da zum Zeitpunkt der Messung eine Lichtquelle mit einer Bandbreite von 150 nm bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm zur Verfügung stand, wurde die Situation genutzt, um das Potential dieser breitbandigeren Lichtquelle für eine Frequenzverschiebung zu messen und mit dem Ti:Saphir-Laser zu vergleichen. Die Bestimmung der Änderung der spektralen Leistungsdichte für dieses Laserspektrum nach Transmission durch die farbstoffgefüllte Küvette wurde analog zur Messung mit dem Ti:Saphir-Laser durchgeführt. Die aus dieser Messung extrahierten Frequenzschwerpunkte sind in 5.3.1(b) als Funktion der Farbstoffkonzentration aufgetragen. Vergleicht man die Verschiebung der Frequenzschwerpunkte beider Spektren bei einer Konzentration von 200 µg/ml, so geht die Verdopplung der Bandbreite nahezu mit der Verdopplung der Verschiebung einher. Daraus wird deutlich, dass hohe optische Bandbreiten nicht nur im Hinblick auf eine Steigerung des Auflösungsvermögens erstrebenswert sind, sondern auch eine höhere Kontraststeigerung in Aussicht stellen. Leider konnte diese Lichtquelle für weitere Messungen in dieser Arbeit nicht zum Einsatz kommen.

Nachdem die Verschiebung des Frequenzschwerpunktes als Funktion der Farbstoffkonzentration in statischer Transmission ermittelt worden ist, folgte die SOCT-Messung. Dazu wurde eine Probe aus Agarosegel (1,5 g Agarose auf 100 ml Nährstoffmedium) hergestellt, welches sich durch seine Homogenität und eine einfache Herstellung auszeichnet. Entscheidend ist, dass es sich dabei um ein leicht streuendes Medium handelt, in dem sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt. Dadurch erfolgt die Absorption gleichförmig über die ganze Tiefe der Probe und kann quantitativ erfasst werden. Zwei kleine Würfel des Gels, einer ohne Farbstoff und der andere mit einer Farbstoffkonzentration von 200 µg/ml, wurden nebeneinander gelegt und in den Fokus des Probenarms positioniert. 100 nebeneinander liegende A-Scans wurden in der niedrigsten Schrittweite (2,6 µm) aufgenommen, nachbearbeitet und in einem Tomogramm dargestellt. Die vierfache laterale Überabtastung wurde eingestellt, um ein mögliches Rauschen des Lasers oder Abbildungsfehler zu erkennen. Das Interferenzsignal wurde mit 2 MHz abgetastet, was bei einer Mittenfrequenz von 190 kHz einer zehnfachen Überabtastung entspricht.

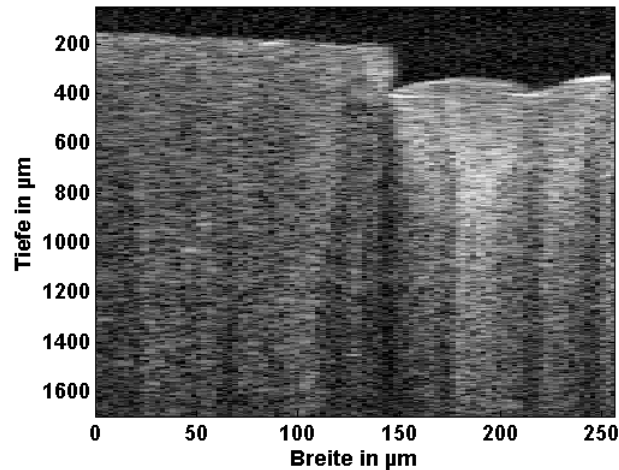
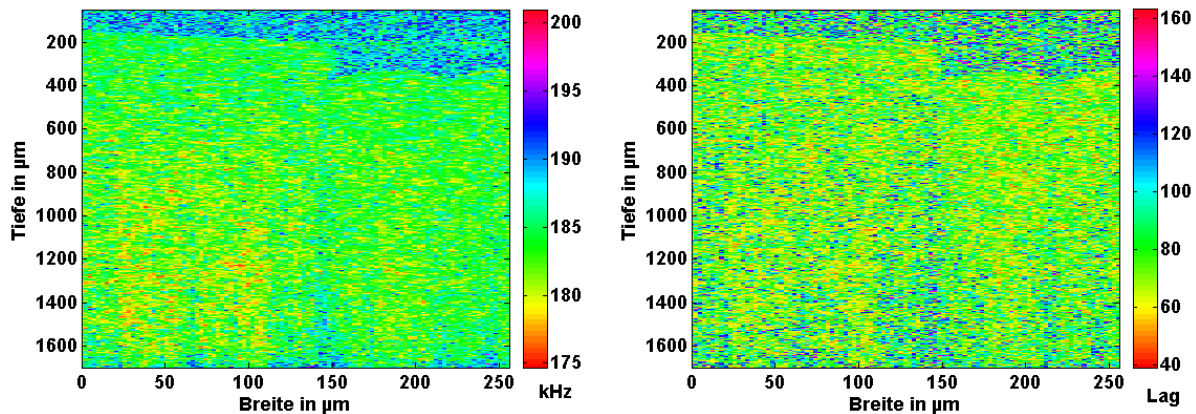


Abbildung 5.3.2: **Zwei nebeneinander liegende Agarosegelwürfel (links gefärbt und rechts ungefärbt) – Klassisches OCT-Schnittbild bzw. V- und S-Graph in der SOCT**

In Abbildung 5.3.2 ist das OCT-Tomogramm der Agarosegelwürfel in einer Graustufendarstellung (V- bzw. S-Graph in der SOCT) zu sehen. Die streuende Struktur des Agarosegels kann eindeutig vom Hintergrund oberhalb von $200\ \mu\text{m}$ im linken Teil bzw. $400\ \mu\text{m}$ im rechten Teil des Tomogramms differenziert werden. Die Grenze beider Würfel wird durch die horizontale Stufe und den vertikalen Spalt bei einer Breite von etwa $150\ \mu\text{m}$ sichtbar. Weiterhin sind in beiden Würfeln senkrechte, dunkle Streifen zu erkennen, welche auf eine Inhomogenität bei der Präparation der Probe zurückzuführen sind. Erwartungsgemäß ist die mittlere zurückgestreute Intensität aus dem linken, angefärbten Würfel aufgrund der Absorption des Farbstoffes geringer als aus dem rechten, ungefärbten Würfel. Das wird insbesondere an der stark zurückstreuenden Inhomogenität im oberen Drittel des rechten Würfels deutlich.



(a) Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Schwerpunktsfrequenz (b) Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Bandbreite der Autokorrelation

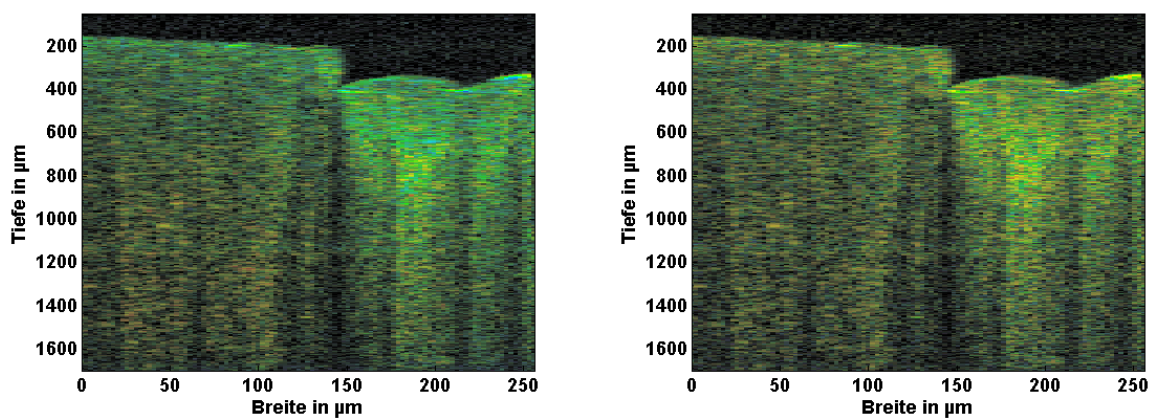
Abbildung 5.3.3: **Zwei nebeneinander liegende Agarosegelwürfel (links gefärbt und rechts ungefärbt) – Spektroskopisches Maß als H -Graph in der SOCT**

In Abbildung 5.3.3 sind die spektroskopischen Maße, Schwerpunktsfrequenz und Bandbreite der Autokorrelation, in Tomogrammen (H -Graphen in der SOCT) mit einer Farbskala dargestellt. Für die Frequenzanalyse betrug die Breite des Hanning-Fensters in der CZT von 160 bis 220 kHz 256 Punkte ($9,2 \mu\text{m}$ in Luft). Das Fenster wurde in Schritten von $2 \mu\text{m}$ (56 Punkten) mit dem Interferenzsignal multipliziert.

Es ist klar zu erkennen, dass sich die Würfel in beiden Graphen eindeutig vom Hintergrund abheben. Selbst die Stufe und der Spalt zwischen den Würfeln kommen zur Geltung. Vergleicht man zunächst nur die Feinheit, mit der die Strukturen in 5.3.3(a) und (b) dargestellt werden, so kann festgehalten werden, dass die senkrechten Inhomogenitäten durch das bandbreitenbezogene Maß in Abbildung 5.3.3(b) erwartungsgemäß besser unterschieden werden können als durch das frequenzbezogene Maß in Abbildung 5.3.3(a).

In 5.3.3(a) kann eine Anfärbung des linken Würfels durch den Farbstoff eindeutig durch die Rotverschiebung der Schwerpunktsfrequenz im unteren Graphen gezeigt werden. Auch im unteren Drittel des rechten Würfels ist eine Rotverschiebung zu beobachten, die jedoch deutlich schwächer ausfällt. Entweder ist diese Rotverschiebung auf die Rayleigh-Streuung zurückzuführen oder sie kann durch die Diffusion des Farbstoffes vom linken in den rechten Würfel erklärt werden. Ein Beitrag des ersten Mechanismus ist wahrscheinlich, da er in allen Messungen an biologischem Gewebe vorkommt [14]. Die Diffusion des Farbstoffes kann nicht ausgeschlossen werden, da in verschiedenen Versuchsreihen, in denen mit Agarosegel und Farbstoffen gearbeitet wurde, gelegentlich unerwartet hohe Rotverschiebungen im ungefärbten Agarosegel beobachtet wurden. Eine genaue Untersuchung konnte noch nicht durchgeführt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit an Vorarbeiten anzuknüpfen [27]. Ungeachtet dessen ist eine Differenzierung beider Würfel durch die Anfärbung möglich und kann als erster erfolgreicher Versuch einer farbstoffinduzierten Kontraststeigerung gewertet werden.

Durch die in Abbildung 5.3.3(b) dargestellte ortsaufgelöste Bandbreite der Autokorrelation können der Spalt zwischen den Würfeln und einige der senkrechten Inhomogenitäten vom Hintergrund differenziert werden. Die Inhomogenität, die sich als Unterschied in der Stärke der Streuung im oberen Drittel des rechten Würfels zeigt – eindeutig im OCT-Tomogramm in Abbildung 5.3.2 zu erkennen – kann durch eine Änderung der Bandbreite der Autokorrelation nicht sichtbar gemacht werden. Konsequenterweise bedeutet dies, dass die Bandbreite der Lichtquelle nicht ausreicht, um Unterschiede des Streuverhaltens, zurückzuführen auf Dichte, Größe und Verteilung der Streuzentren, in dieser Größenordnung aufzuzeigen. Ein Einfluss der Absorption auf dieses Maß kann nicht eindeutig festgestellt werden, obwohl die Bandbreite der Autokorrelation im angefärbten unteren linken Teil, wie auch im Fall der Absorptionsfilter, leicht zu kleineren Bandbreiten verschoben ist.



(a) Ortsaufgelöste Schwerpunktsfrequenz als spektroskopische Metrik

(b) Ortsaufgelöste Bandbreite der Autokorrelation als spektroskopische Metrik

Abbildung 5.3.4: **Zwei nebeneinander liegende Agarosegelwürfel (links gefärbt und rechts ungefärbt) – HSV-Graph in der SOCT**

Die soeben diskutierten Graphen 5.3.2 und 5.3.3 sind zu einem HSV-Graphen zusammengesetzt in Abbildung 5.3.4 dargestellt. In beiden Tomogrammen setzt sich das zurückstreuende Agarosegel klar vom Hintergrund ab. Die aneinander liegenden Agarosegelwürfel können durch die Stufe und den physikalischen Schnitt bei einer Breite von $150\ \mu\text{m}$ differenziert werden. Zusätzlich kann in Abbildung 5.3.4(a) im Gegensatz zu 5.3.4(b) der angefärbte Würfel vom ungefärbten Würfel anhand der ausgewerteten Frequenzinformation – hier der ortsaufgelösten Frequenzschwerpunktsverschiebung des Laserspektrums – unterschieden werden. Die Rotverschiebung des Frequenzschwerpunktes im unteren Drittel des linken Würfels im Vergleich zum unteren Drittel des rechten Würfels verdeutlicht diesen Kontrast zwischen beiden Seiten. Damit ist gezeigt, dass im Fall von Abbildung 5.3.4(a) eine eindeutige Kontraststeigerung im Vergleich zum OCT-Tomogramm (Abbildung 5.3.2) durch die Frequenzanalyse der Interferenzdaten erreicht wurde. Es wird jedoch auch deutlich, dass eine relativ große optische Weglänge nötig ist, damit eine Verschiebung des Frequenzschwerpunktes zur Kontraststeigerung genutzt

werden kann. Dies geht allerdings mit einem Intensitätsverlust einher, so dass eine genaue Abwägung zwischen intensitätsbasiertem und spektroskopischem Kontrast für das Einsatzgebiet des Farbstoffes erforderlich ist.

Für eine quantitative Analyse der Schwerpunktsverschiebung wurde der Datensatz aus Abbildung 5.3.3(a) an der Grenze der Würfel geteilt. Die A-Scans der beiden daraus entstandenen Frequenzdatensätze wurden jeweils gemittelt und als Funktion der Eindringtiefe in Abbildung 5.3.5 dargestellt. Mittels linearer Regression wurde eine Gerade an die Punkte von 200 μm bis 1200 μm der roten Kurve gelegt und eine Gerade an die Punkte von 400 μm bis 1400 μm der grünen Kurve gelegt.

Der Hintergrund ist auf den ersten hundert Mikrometern signifikant vom Gel zu unterscheiden. Dieser liegt, wie durch das Frequenzintervall der CZT (160 kHz-220 kHz) festgelegt, in der Mitte dieser Spanne um 190 kHz. Beim Übergang von Luft zum Agarosegel fallen beide Kurven auf einen Wert von 184 kHz, der Schwerpunktsfrequenz des Laserspektrums (rote Kurve bei 200 μm – angefärbter linker Würfel bzw. grüne Kurve bei 400 μm – ungefärbter rechter Würfel). Während die grüne Kurve, repräsentativ für die Verschiebung der Schwerpunktsfrequenz des ungefärbten Würfels, bis zu einer Tiefe von etwa 1,5 mm mit einer Steigung von nur 0,2% pro Millimeter fällt, weist die rote Kurve, bezeichnend für die Verschiebung des angefärbten Würfels, eine durchschnittliche Verschiebung von 1,5% pro Millimeter auf der gleichen zurückgelegten optischen Wegstrecke auf. Ab etwa 1,5 mm tritt in beiden Hälften eine Blauverschiebung ein.

Diese Blauverschiebung ist auf den mit der Tiefe zunehmenden Verlust der Gesamtintensität zurückzuführen. Sie wird durch eine stärkere Gewichtung des blauen Hintergrunds bei der Schwerpunktsberechnung verursacht. Die im Vergleich zum rechten Würfel stärkere Rotverschiebung im linken Agarosegelwürfel ist eindeutig durch den Farbstoff induziert worden. Auffällig ist jedoch, dass aus den Geraden der Abbildungen 5.3.1(b) und 5.3.5 zu entnehmen ist, dass die beobachtete Frequenzverschiebung im angefärbten Würfel von 1,5% pro Millimeter von der zu erwartenden Verschiebung von 4% pro Millimeter um mehr als einen Faktor zwei abweicht. Eine Reduktion der optischen Bandbreite durch den analogen Bandpass, wie sie im Versuch in Abschnitt 5.1 aufgetreten ist, kann diese Diskrepanz alleine nicht erklären. Folgende Punkte stehen zur Diskussion:

1. Der Farbstoff kann, wie schon anfangs bemerkt, durch den in die Probe fokussierten Laserstrahl teilweise ausgeblendet sein. Es benötigt eine gewisse Zeit (bis zu einigen Minuten) die Probe so auszurichten, dass der gewünschte Ausschnitt im abgetasteten Bereich liegt.
2. Teile des Farbstoffes könnten in dieser Zeit in den daneben liegenden Würfel diffundiert sein. Das kommt einer Verdünnung des Farbstoffes gleich und kann somit zu einer kleineren Verschiebung führen.
3. Fehler in der Herstellung der Probe, wie z.B. inhomogene Verteilung des Farbstoffes, sind nicht auszuschließen.

4. Die Inhomogenität des Agarosegels sollte genannt werden. Sie können sowohl bei der Berechnung des Frequenzschwerpunktes als auch bei Mittelung der ortsabhängigen Spektren zu Verschiebungen in den roten oder blauen Spektralbereich führen. Dadurch, dass die zurückgestreute Intensität durch die Inhomogenitäten lokal variiert, werden die spektralen Anteile in der Schwerpunktsberechnung unterschiedlich gewichtet.
5. Es sollte beachtet werden, dass im Gegensatz zu einem Absorptionsfilter auch noch der Verlust der Bandbreite durch Streuung auftritt. Hierzu wurde gezeigt, dass sich beim Einsatz von NIR-Farbstoffen in leicht streuendem Gewebe, wozu auch das Agarosegel zählt, die Absorptions- und Streukoeffizienten (vgl. Gleichung 2.2.2) additiv verhalten. Der wellenlängenabhängige Absorptionskoeffizient dominiert, während der Streukoeffizient im spektralen Bereich von 700 nm bis 900 nm monoton und nahezu linear fällt [20].

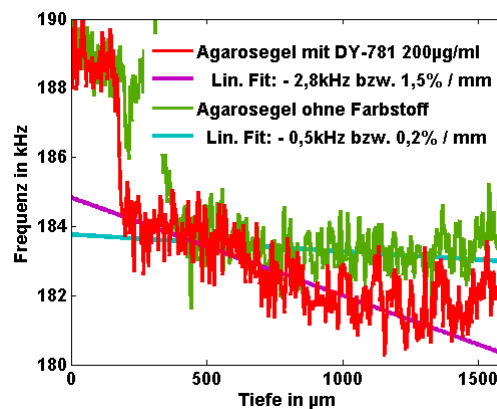


Abbildung 5.3.5: Mittlere Verschiebung des Frequenzschwerpunktes für den gefärbten und ungefärbten Agarosegelwürfel aus Abbildung 5.3.3(a) als Funktion der Eindringtiefe

Auch wenn keine quantitative Übereinstimmung vorliegt, konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, dass eine Kontraststeigerung durch den gezielten Einsatz von NIR-Farbstoffen in leicht streuendem Gewebe möglich ist. Dazu werden längere optische Weglängen benötigt und ein Kompromiss zwischen Schwerpunktsverschiebung und absorptionsbedingtem Intensitätsverlust muss gefunden werden. Die Absorptionseigenschaften des Farbstoffes DY-781 begünstigen durch die Position der Transmissionskante nahe der Zentralwellenlänge diesen Kompromiss. Allerdings muss sicher gestellt werden, dass der Farbstoff bei der in der SOCT eingesetzten Leistungen in der Probe über einen ausreichenden Zeitraum stabil ist. Außerdem müssen die Diffusionseigenschaften des Farbstoffes, insbesondere im Hinblick auf den Einsatz in biologischen Proben, analysiert werden. Auch wenn die zur Verfügung stehende Bandbreite der Lichtquelle eingeschränkt ist, können Verschiebungen mit einer Steigung von 1,5% der Mittenfrequenz pro

Millimeter durchdrungenen Materials in einem *HSV*-Graphen zur Kontraststeigerung genutzt werden. Die beobachtbare Verschiebung liegt bereits nahe des Detektionsrauschens von 1% (vgl. Abschnitt 3.4.6). Deshalb wird eine Erhöhung der optischen Bandbreite im Bezug auf eine Steigerung des Auflösungsvermögens und eine Zunahme der Sensitivität beider spektroskopischer Metriken zur Kontraststeigerung angestrebt.

5.4 Anfärbung einer Blattader

Nachdem eine Kontraststeigerung mittels NIR-Farbstoffen an einem Gewebemodell gezeigt worden ist, wurde diese Möglichkeit auch an einem praxisnahen biologischen Präparat erprobt. Im Gegensatz zum Einrühren eines Farbstoffes in ein aushärtendes Gel, stellt das zerstörungsfreie Einbringen eines Farbstoffes in eine biologische Probe im Allgemeinen eine Herausforderung dar. Da nur wenig über das Diffusionsverhalten des gewählten Farbstoffes bekannt war, wurde zunächst nach einer alternativen Möglichkeit gesucht. Die Kapillarkräfte des feinmaschigen Adernetzwerkes eines Blattes kamen als zuverlässiger Transportmechanismus für einen Farbstoff in Frage.

Um ein Maximum an Farbstoffaufnahme zu garantieren, wurden Blätter ähnlicher Größe und verschiedener Spezies zunächst einmal mit ihrem senkrecht angeschnittenen Leitbündel in eine definierte Farbstofflösung (Hämatoxilin) gestellt, welche durch eine kräftige rote Färbung charakterisiert ist und insbesondere in der Histologie zur Färbung von Gewebeschnitten eingesetzt wird. Nach mehreren Minuten bis Stunden konnte beobachtet werden, wie die Farbstofflösung entlang der Hauptblattader über die Nebenadern in das gesamte Blattgewebe eindrang. Das Blatt des schwarzen Holunder (*sambucus nigra*) zeichnete sich hierbei im Vergleich zu allen anderen Spezies durch seine starke Farbaufnahme aus.

Darauf folgend wurden zwei gleichgroße Blätter dieser Spezies mit ihren Leitbündeln in zwei Farbstofflösungen gleicher Volumina (200 μ l) gestellt. Während die eine Lösung ein Hämatoxilin-Wasser-Gemisch (1:1) enthielt, wurde der anderen Lösung noch der in DMSO verdünnte Farbstoff DY-781 hinzu gegeben, so dass letztere eine Konzentration von 500 μ g/ml des NIR-Farbstoffes enthielt. Dies sollte, beruhend auf den Ergebnissen des vorherigen Versuches, eine starke spektrale Änderung des SOCT-Signals sicherstellen. Sobald die Farbstofflösungen nahezu vollständig von den Blättern absorbiert worden war, wurde jeweils die Hauptblattader der Blattunterseite im Querschnitt gemessen, da diese die höchste Farbstoffkonzentration aufwies. Es wurden neben angefärbten auch unangefärbte Blätter als Referenzproben vermessen.

Zum Vergleich wurde ein Gewebeschnitt einer Hauptblattader angefertigt und mit Hilfe eines Mikroskopes aufgenommen. Die lichtmikroskopische Aufnahme ist in Abbildung 5.4.1 wiedergegeben.

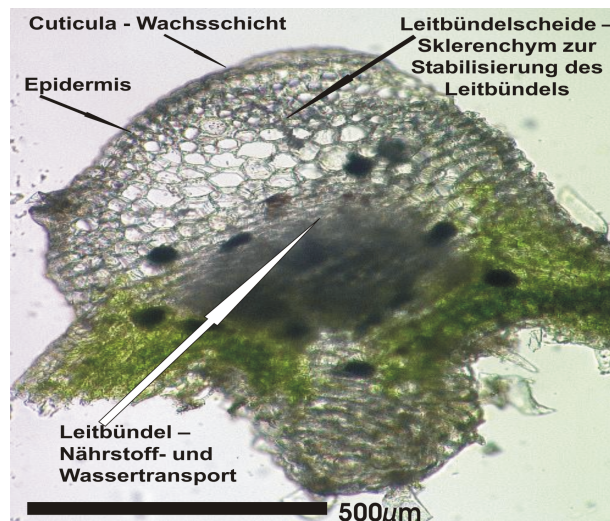


Abbildung 5.4.1: Mikroskopaufnahme der Hauptblattader eines Holunderblattes (*sambucus nigra*)

Betrachtet man die Aufnahme von oben nach unten, so kann die erste Zellschicht oder Epidermis, welche für den Gasaustausch über die Spaltöffnungen verantwortlich ist, von den restlichen größeren Zellen gut unterschieden werden. Die darüber liegende Cuticula, eine faltenwerfende Wachsschicht, die als Transpirationsschutz dient, ist kaum erkennbar, was auch schon auf die beobachtete starke Saugkraft des Holunder hinweist. Die unter der Epidermis liegenden größeren Zellen gehören zur Leitbündelscheide, welche der Stabilisierung des Leitbündels dient. Dieses wird zum Transport von Wasser und Nährstoffen, also auch des Farbstoffes, genutzt. Die schwarzen Gebilde sind vermutlich Sklerenchymzellen, welche zur weiteren Stabilisierung des Blattes beitragen. Die grüne Farbe entstammt dem zur Photosynthese dienenden Chlorophyll und deutet den Ansatz der Blattspreite an.

Für die folgende SOCT-Messung wurden 100 nebeneinander liegende A-Scans mit einer Schrittweite von $7,8\ \mu\text{m}$ aufgenommen, nachbearbeitet und in einem Tomogramm dargestellt. Die laterale Überabtastung (4/3-fach) wurde – wie in der OCT üblich – genutzt, um einen weicheren Bildverlauf zu erzielen. Damit die zur Diskussion stehenden Einzelheiten in den Intensitäts- und Frequenzgraphen besser herausgearbeitet werden können, wurde auf die Beibehaltung des Bildseitenverhältnisses in den folgenden Graphen verzichtet. Das Interferenzsignal wurde mit 2 MHz abgetastet, was bei einer Mittenfrequenz von 190 kHz einer zehnfachen Überabtastung entspricht.

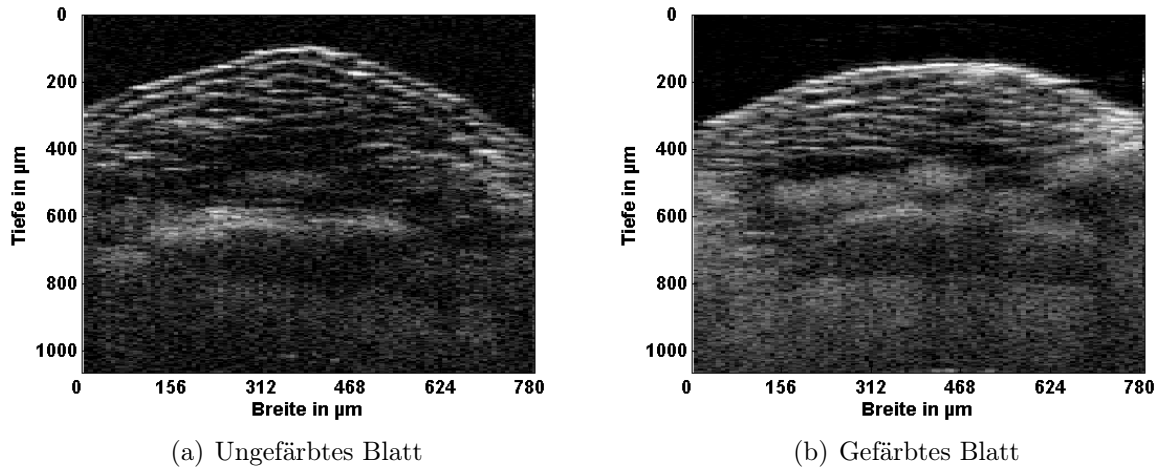


Abbildung 5.4.2: **OCT-Tomogramm der Hauptblattader zweier Holunderblätter (*sambucus nigra*) – *S*- und *V*-Graph in der SOCT**

In Abbildung 5.4.2 ist je ein beispielhaftes Tomogramm (*S*- und *V*-Graphen in der SOCT) einer Blattader eines ungefärbten (a) und gefärbten (b) Blattes dargestellt. Die Epidermis, die Zellen der Leitbündelscheide sowie die größeren Zellen des Leitbündels werden in beiden Tomogrammen deutlich dargestellt, wie sich aus dem Vergleich mit der mikroskopischen Aufnahme 5.4.1 ergibt. Abweichungen in der geometrischen Form der Blattader und anderer Strukturen sind hierbei auf die Individualität eines jeden Blattes zurückzuführen.

Besonders markant ist die im Vergleich zur ungefärbten Ader starke Rückstreuung in den tieferen Schichten des gefärbten Präparates. Dieser charakteristische Unterschied in der OCT Darstellung mit und ohne Farbstoff konnte anhand von Messungen an mehreren Blattproben eindeutig auf die Farbstofflösung zurückgeführt werden. Bestätigt wird diese Beobachtung durch die folgende Betrachtung der orts aufgelösten Frequenzanalyse.

Die Falschfarbendarstellungen der spektroskopischen Maße, Schwerpunktsfrequenz und Bandbreite der Autokorrelation, für die ungefärbte und gefärbte Blattader sind in Abbildung 5.4.4 und 5.4.3 gegeben. Für die zugrundeliegende Frequenzanalyse betrug die Breite des Hanning-Fensters in der CZT (160 kHz bis 220 kHz) 256 Punkte (9,2 µm in Luft). Das Fenster wurde in Schritten von 2 µm (56 Punkten) mit dem Interferenzsignal multipliziert.

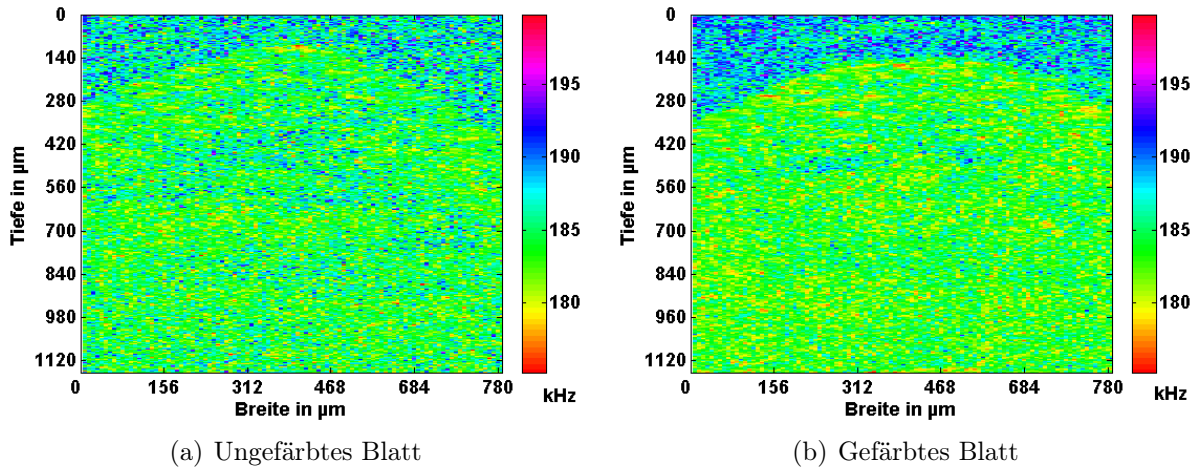


Abbildung 5.4.3: Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung des Frequenzschwerpunktes aus den zu Abbildung 5.4.2 gehörigen Frequenzdaten der Hauptblattader der Holunderblätter (*sambucus nigra*)

In Abbildung 5.4.3 ist die Schwerpunktsfrequenz für die Blattader des ungefärbten (a) und des gefärbten Blattes (b) in Tomogrammen (H -Graphen in der SOCT) mit einer Farbskala dargestellt. Die Strukturen der Blattader heben sich in den schwerpunktsbezogenen Tomogrammen erwartungsgemäß nicht mit der gleichen Feinheit des bandbreitenbezogenen Maßes ab. Sie sind jedoch eindeutig vom Hintergrund oberhalb von $140\ \mu\text{m}$ und den Zellzwischenräumen zu trennen.

Beide Graphen 5.4.3(a) und (b) unterscheiden sich hinsichtlich ihres Kontrastes zwischen den Blattstrukturen von Epidermis, Leitbündelscheide und Leitbündel und den unausgefüllten bzw. nicht zurückstreuenden Zwischenräumen. Eine im Vergleich zur ungefärbten Blattader eindeutige Rotverschiebung ist in der angefärbten Blattader zu erkennen. Auffällig ist hierbei, dass die Rotverschiebung nahezu homogen über die Schnittfläche in der relativ inhomogen strukturierten Blattader verteilt ist. Eine Zunahme der Rotverschiebung mit der Tiefe ist nicht festzustellen.

Die ortsaufgelöste Bandbreite der Autokorrelation als Maß für die spektroskopische Antwort der Probe zeigt ein ähnliches Verhalten.

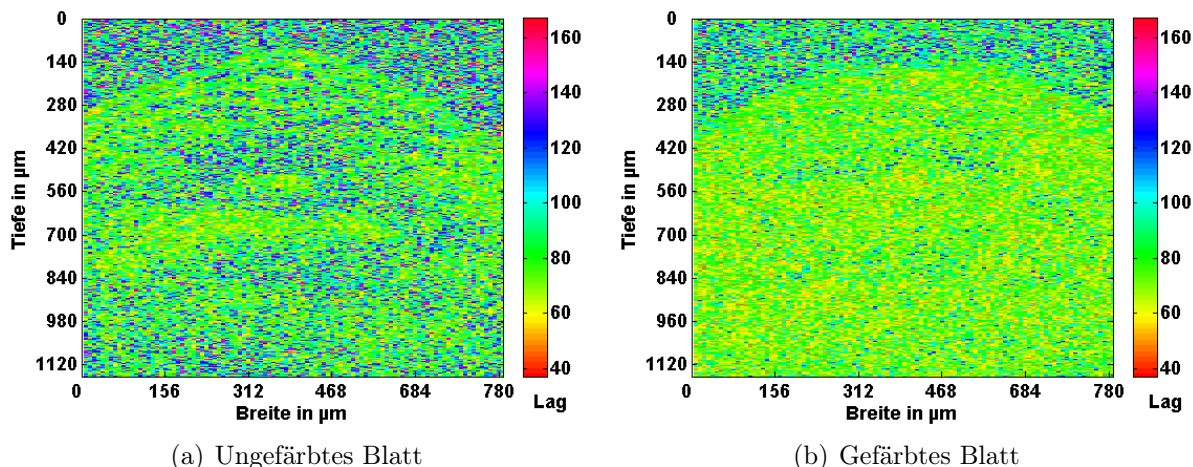


Abbildung 5.4.4: **Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Bandbreite der Autokorrelation aus den zu Abbildung 5.4.2 gehörigen Frequenzdaten der Hauptblattader der Holunderblätter (*sambucus nigra*)**

In beiden Tomogrammen der Abbildung 5.4.4 sind die Strukturen der Blattader in einer bandbreitenbezogenen Darstellung (H -Graphen in der SOCT) zu sehen. Sie sind vom Hintergrund oberhalb von $140\ \mu\text{m}$ wie auch von den unausgefüllten Teilen des Aderinneren hervorgehoben. Diese Zellzwischenräume sind in 5.4.4(a) klarer zu differenzieren als in 5.4.4(b). Hier entsteht der Eindruck, als ob die Blattader nahezu gleichmäßig ausgefüllt wäre.

In 5.4.4(a) ist von den obersten Zellschichten zum Gewebe in der Mitte des Leitbündels eine Verschiebung zu kleineren Bandbreiten zu beobachten, welche auf eine Änderung der Dichte, Größe und Verteilung der Streuzentren zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 4.2). Damit kann diese ortsaufgelöste strukturbetonende Darstellung der Bandbreite der Autokorrelation als zusätzliche Information über die Probe zur Steigerung des Kontrastes genutzt werden. Hier reicht vermutlich die Bandbreite der Lichtquelle nicht aus, um den strukturellen Unterschied von den obersten Zellschichten zum Leitbündel noch deutlicher zu machen.

Wertet man die Schwerpunktsverschiebung quantitativ aus, indem die mittlere Verschiebung als Funktion der Tiefe dargestellt wird, kann gezeigt werden, wie diese Graphen zu interpretieren sind.

Für eine quantitative Analyse der Schwerpunktsverschiebung sind die Frequenzdaten der A-Scans aus beiden Abbildungen 5.4.3(a) und (b) jeweils gemittelt und als Funktion der Tiefe in Abbildung 5.4.5 dargestellt worden. Mittels linearer Regression wurden zwei Geraden als Maß der Verschiebung für die gemittelten Frequenzschwerpunkte der grünen (ungefärbtes Blatt) und roten (gefärbtes Blatt) Kurve berechnet. Hierfür wurden die Punkte oberhalb von $300\ \mu\text{m}$ Tiefe vernachlässigt.

Auf den ersten $100\ \mu\text{m}$ oberhalb der Blattader wird die ermittelte Schwerpunkts-

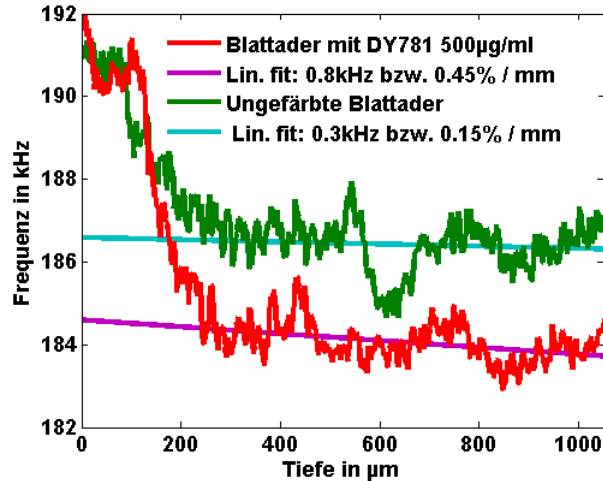


Abbildung 5.4.5: Mittlere Verschiebung des Frequenzschwerpunktes für die gefärbte und ungefärbte Hauptblattader beider Holunderblätter (*sambucus nigra*) als Funktion der Eindringtiefe aus Abbildung 5.4.3

frequenz des OCT-Signals durch das Hintergrundrauschen bestimmt. Dieses liegt wie durch das Frequenzintervall der CZT (160 kHz-220 kHz) festgelegt in der Mitte dieser Spanne um 190 kHz. Es folgen bis etwa 300 μm die obersten Zellschichten, welche den mittleren Schwerpunkt mit zunehmender Breite der Ader auf unterschiedliche Niveaus, einmal 186,5 kHz (grüne Kurve) und 184 kHz (rote Kurve), der Schwerpunktsfrequenz des Laserspektrums, herabsenken. Von dort aus sinken die gemittelten Frequenzschwerpunkte mit unterschiedlicher Steigung, 0,15% pro Millimeter und 0,45% pro Millimeter, bis etwa 900 μm . Unterhalb dieser Tiefe erfahren beide Schwerpunkte eine leichte Blauverschiebung.

In Regionen der Adern, in der die Rückstreuung niedrig ist, wie z.B. in der ungefärbten Blattader, wird der blaue Hintergrund bei der Schwerpunktsberechnung stärker gewichtet als in Regionen höherer Rückstreuung, so dass in diesen Bereichen eine Blauverschiebung bezüglich der Schwerpunktsfrequenz der Laserspektrums zu beobachten ist. Dies zeigt, dass der Frequenzschwerpunkt nicht nur die Absorption sondern auch die Rückstreuung berücksichtigt. Das Minimum der grünen Kurve bei einer Tiefe von 600 μm unterstreicht diesen Effekt. Im entsprechenden OCT-Tomogramm 5.4.2(a) ist an dieser Stelle ein stark streuender Teil des Leitbündels umgeben von schwach streuenden Zellzwischenräumen zu sehen. Obwohl keine Rotverschiebung mit zunehmender Tiefe in Abbildung 5.4.3 zu erkennen ist, kann aufgrund der unterschiedlichen Geradensteigung von einer tiefenabhängigen Verschiebung ausgegangen werden. Es ist jedoch zu klären, wodurch die Abweichung der Rückstreuung und die unterschiedliche Steigung der Verschiebung den Blattadern verursacht wird.

Aus den Messungen resultiert, dass sich das gefärbte Blatt vor allem durch erhöhte Rückstreuung in tieferen Bereichen vom ungefärbten Blatt abhebt. Neben dem Farbstoff kann auch das verwendete Lösungsmittel DMSO für eine Steigerung der Rückstreuung verantwortlich sein. Das ebenfalls in der Farbstofflösung enthaltene Hämatoxylin kann als Ursache ausgeschlossen werden, da es in gleicher Konzentration auch im ungefärbten Blatt vorliegt. Obwohl DMSO die Eigenschaft besitzt den Transport einer gelösten Substanzen in Zellen hinein zu unterstützen, wirkt dieses organische Lösungsmittel in zu hohen Konzentrationen zytotoxisch. Es kann angenommen werden, dass dadurch nicht nur die Funktionsweise der Zelle beeinträchtigt wird, sondern auch die strukturelle Integrität. Das macht sich auch in einer Veränderung des Rückstreuerverhaltens bemerkbar. In der Zellkulturtechnik wird üblicherweise mit 10%-iger DMSO-Lösung gearbeitet. Bei dem hier vorgestellten Versuch betrug die DMSO-Konzentration der Farbstofflösung 50%. Deshalb ist eine strukturelle Veränderung der Probe durch die Farbstofflösung eine wahrscheinliche Erklärung für die erhöhte Rückstreuung der angefärbten Probe. Da der Farbstoff nicht nur in DMSO gelöst werden kann, sollte ein Versuch mit anderen Lösungsmitteln eine genaue Auskunft über den Einfluss des Lösungsmittels auf das Rückstreuerverhalten geben.

Ferner gilt zu klären, ob durch die Absorption des Farbstoffes die Diskrepanz in der Steigung der Verschiebung zwischen dem angefärbten und ungefärbten Blatt erklärt werden kann. Im Vergleich zum Versuch mit dem Agarosegel wurde in diesem Experiment die Farbstoffkonzentration mehr als verdoppelt. Das sollte zu einer signifikanten Schwerpunktsverschiebung im mehrfachen Prozentbereich pro Millimeter Eindringtiefe führen, welche allerdings nicht beobachtet wurde. Es ist jedoch zu beachten, dass sich der Farbstoff im Gegensatz zum Agarosegel nur inhomogen und über das ganze Blatt verteilt. Dadurch kann nicht nachvollzogen werden, wie viel Farbstoff an der gemessenen Position zu erwarten ist. Berücksichtigt man allerdings die im Agarosegel entdeckte Diskrepanz zwischen erwarteter und tatsächlich beobachteter Verschiebung, so ist eine farbstoffbedingte Schwerpunktsverschiebung nicht auszuschließen. Obwohl der absolute Wert der Frequenzverschiebung (0,45% pro Millimeter) im Vergleich zum erwarteten Wert (mehrere Prozent pro Millimeter) klein ist, unterscheidet sich die Geradensteigungen der angefärbten und ungefärbten Blattader um einen Faktor drei, was für die farbstoffinduzierte Absorption als dominierenden Prozess der Verschiebung spricht. Dadurch, dass der Unterschied der zurückgestreuten Intensität zwischen dem un- und angefärbten Blatt relativ groß ist, während die absorptionsbedingte Dämpfung in diesem Fall nur einen marginalen Effekt auf die Verschiebung haben kann, wird nur eine genauere Untersuchung zeigen, worauf die durch die Farbstofflösung erzeugte Frequenzverschiebung zurückzuführen ist.

In Abbildung 5.4.6 ist sowohl das OCT-Tomogramm als auch jeweils ein *HSV*-Graph mit der orts aufgelösten Schwerpunktsfrequenz als Farbtonmaßstab dargestellt, wobei hier das Bildseitenverhältnis berücksichtigt wurde. Im Vergleich zum ungefärbten Blatt kommt insbesondere das Leitbündel, durch das der Farbstoff in das Blatt gelangt ist, in den Darstellungen der gefärbten Blattader deutlicher zur Geltung. Ebenfalls ist ein Unterschied zwischen den *HSV*-Graphen und den entsprechenden OCT-Tomogrammen zu bemerken. In der SOCT-Darstellung sind die Strukturen der Adern deutlicher von

den nicht zurückstreuenden Zellzwischenräumen zu differenzieren. Damit kann von einer farbstoffinduzierten Kontraststeigerung gesprochen werden, die durch die Frequenzanalyse des Interferenzsignals erreicht wurde. Da gezeigt wurde, dass in diesem Beispiel beide spektroskopischen Metriken vom Informationsgehalt nahezu identisch sind, wurde hier auf eine Darstellung des *HSV*-Graphen mit der orts aufgelösten Bandbreite verzichtet.

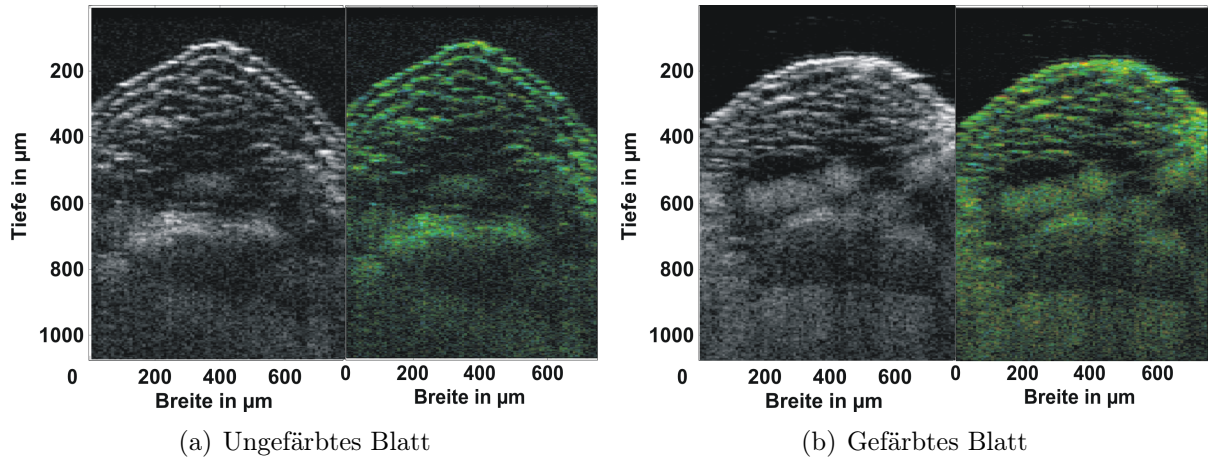


Abbildung 5.4.6: **OCT und SOCT-Tomogramm der Hauptblattader beider Holunderblätter (*sambucus nigra*)**

In diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Bandbreite der Autokorrelation geeignet ist, gewebespezifische Merkmale zu differenzieren. Um eine signifikante Kontraststeigerung zu ermöglichen, wird allerdings eine höhere optische Bandbreite benötigt. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Schwerpunktsverschiebung vom Rückstreuverhalten verdeutlicht, was auch hier eine zum bandbreitenbezogenen Maß analoge Vertiefung der Interpretation notwendig macht. Gerade wenn sich die Absorptions- und Rückstreuungskoeffizienten der Probe in der gleichen Größenordnung bewegen, kann man einen zur x -Achse parallelen Versatz der mittleren Schwerpunktsfrequenz als Maß der in der Probe vorhandenen Rückstreuung interpretieren. Dies erscheint durch die beschriebene Blauverschiebung schwach streuender Regionen gerechtfertigt. In diesem Fall beschreibt die Steigung der Geraden den wellenlängenabhängigen Intensitätsverlust durch Absorption und Streuung, so dass die Ursache der Schwerpunktsverschiebung nicht eindeutig zu bestimmen ist. Das bedeutet zunächst einmal, dass – solange nicht eine genauere Untersuchung der Wirkungsweise der Farbstofflösung durchgeführt wurde – entweder die Streuung oder die Absorption zur Kontraststeigerung genutzt werden kann. Um jedoch eine eindeutige absorptionsbedingte Kontraststeigerung in der Blattader zu erreichen, ist aus diesem Versuch klar geworden, dass der Einsatz einer größeren Menge des NIR-Farbstoffe erforderlich ist.

Des Weiteren wurde in diesem Versuch eine Grenze für die noch im *HSV*-Graphen darstellbare Kontraststeigerung gezeigt. Während sich eine Steigung von 1,5% der Mittelfrequenz pro Millimeter Eindringtiefe im Fall des angefärbten Agarosegels erkennbar heraushebt, ist eine Steigung von 0,5% pro Millimeter bei einem zum Agarosegel

vergleichbaren Rauschen nicht mehr mit dem bloßen Auge aus dem *HSV*-Graphen zu detektieren. Ungeachtet dessen konnte eine farbstoffinduzierte Kontraststeigerung durch die Frequenzanalyse des Interferenzsignals an einem pflanzlichen Präparat gezeigt werden.

5.5 Anfärbung von Zellsphäroiden

Nachdem das Verhalten des gelösten Farbstoffes an einem vereinfachten Gewebemodell, dem Agarosegel, untersucht worden ist, wurde parallel zur pflanzlichen Anfärbung eine Erprobung an menschlichen Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zur allgegenwärtigen Flora ist eine stetige Verfügbarkeit menschlicher, für die Untersuchung relevanter Exzidate nicht gewährleistet. Darüber hinaus zeichnen sich diese Proben aufgrund ihrer Individualität durch eine große Variation aus, was die Untersuchung einer großen Stichprobenzahl erfordert. Aus diesen Gründen wurde in einem ersten Schritt eine Anfärbung an einem auf Zellsphäroiden basierenden Gewebemodell durchgeführt.

Ein Zellsphäroid ist eine gewachsene dreidimensionale Aggregation von Zellen, die dem von menschlichen Gewebe sehr nahe kommt. Die Zellen interagieren und bilden untereinander Kontaktstellen aus, wie dies sonst im Gewebe auch der Fall ist. Im Gegensatz zur herkömmlichen Zellkultur, in der Zellen in einer Ebene auf einem Nährmedium, dem so genannten Monolayer, wachsen, können die Zellen in einem speziellen Verfahren dazu gebracht werden, in einer kugel- bis ellipsoidförmigen Anordnung zu einem Sphäroiden zu wachsen.

Diese so genannten Sphäroide wurden von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen aus zwei verschiedenen Urothelkarzinomzelllinien (RT4 und J82) der Blase hergestellt [28]. Die aus Zellen des Übergangsepithels (innere Auskleidung der Harnblase) kultivierten Sphäroide sollen zunächst als Modell für das Urothel hinsichtlich einer Markierung und der damit verbundenen Kontraststeigerung durch einen NIR-Farbstoff dienen und spektroskopisch untersucht werden. Diese Zellen wurden aus Tumorgewebe eines einzelnen Patienten isoliert und immer weiter kultiviert. Dabei unterscheiden sich beide im Grad ihrer Entdifferenzierung, also dem Unterschied zu normalen Zellen. RT4 ist dabei weiter entartet als J82, hat also weniger Ähnlichkeit mit normalem Urothel und repräsentiert einen aggressiveren Tumor. Die Sphäroide aus der Zelllinie RT4 weisen eine höhere Packungsdichte auf als Sphäroide aus der Zellreihe J82.

Langfristiges Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist die Darstellung eines tumorbedingten Durchbruchs des Epithels durch die Basalmembran in der Blase. Dieser Durchbruch korreliert mit der Bildung von Metastasen und damit mit der Diagnose eines bösartigen (malignen) Tumors. Diese Diagnostik ist mittels der klassischen OCT aufgrund des geringen gewebespezifischen Kontrastes nur sehr eingeschränkt möglich. Eine farbstoffinduzierte Kontraststeigerung könnte hier die entscheidende Sicherheit in der Diagnose ermöglichen.

Basierend auf den Farbstoffversuchen mit dem Agarosegel kann von einem Diffusionspotential des in DMSO gelösten DY-781 ausgegangen werden. Daher wurde für den ersten Versuch in dieser Reihe ein Sphäroid der Zelllinie RT4 für etwa zehn Minuten in eine Farbstofflösung mit einer Konzentration von $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ getaucht. Es wurde dann neben ein gleichartiges ungefärbtes Sphäroid auf einem Agarosegel positioniert und vermessen. Für die folgenden SOCT-Messung von Sphäroiden wurden 150 nebeneinander liegende A-Scans mit einer Schrittweite von $7,8\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Das Interferenzsignal wurde immer mit $2\ \text{MHz}$ abgetastet, was bei einer Mittenfrequenz von durchschnittlich $190\ \text{kHz}$ einer zehnfachen Überabtastung entspricht. Im Anschluss an die Nachverarbeitung dieser Daten wird das SOCT-Bild in einem *HSV*-Graphen dargestellt.

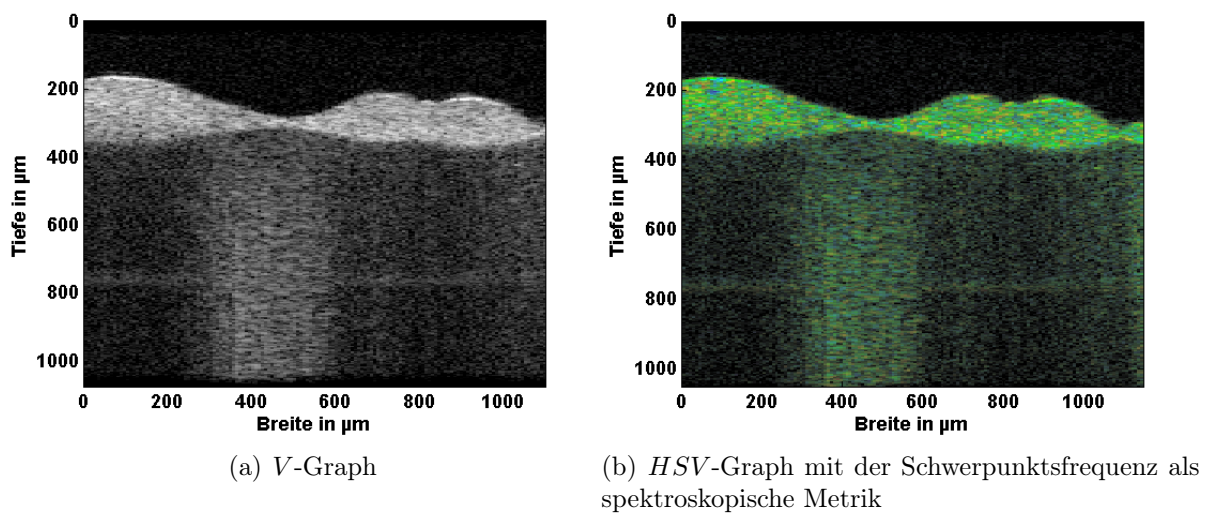


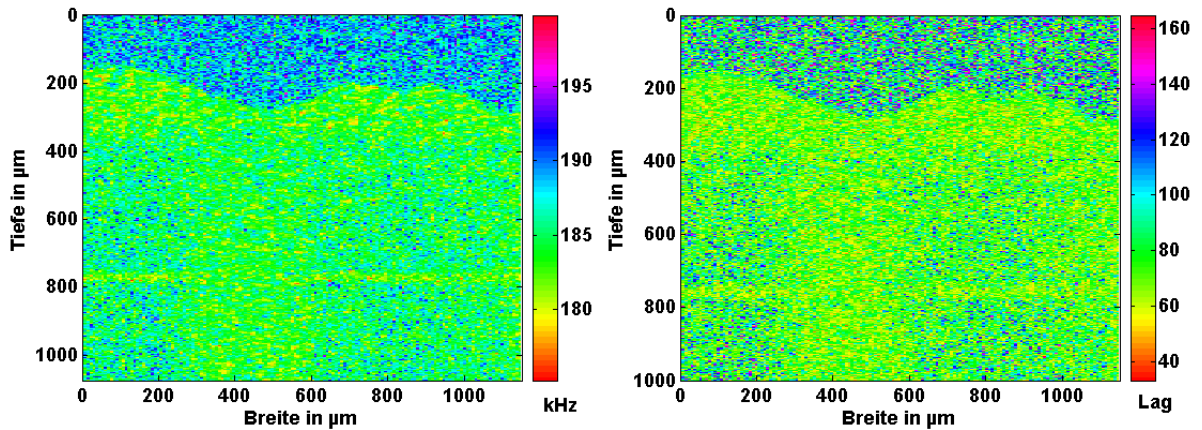
Abbildung 5.5.1: **OCT- und SOCT-Tomogramme zweier Sphäroide (RT4) auf Agarosegel**

In Abbildung 5.5.1 sind die OCT- und SOCT-Tomogramme der nebeneinander liegenden Sphäroide in einer Tiefe von etwa $200\ \mu\text{m}$ bis $400\ \mu\text{m}$ zu sehen. Für den *HSV*-Graphen wurde der Frequenzschwerpunkt als farbtonegebender Graph verwendet. Das linke angefärbte Sphäroid ist ein wenig voluminöser als das rechte ungefärbte Doppelsphäroid. Beide Sphäroide berühren sich bei einer Breite von $500\ \mu\text{m}$. Während das Agarosegel unterhalb eines jeden Sphäroids nicht zu sehen ist, kann es eindeutig unterhalb des Berührungspunktes der Sphäroide identifiziert werden. Es zu beobachten, dass die mit zunehmender Dicke des Sphäroids zurückgestreute Intensität aus dem Agarosegel erwartungsgemäß abfällt. Ein Vergleich der Agarose zwischen dem dickeren linken Sphäroid und dem dünneren rechten Doppelsphäroid und eine Begutachtung der Randbereiche der Sphäroide verdeutlicht diese Tendenz. Im für die Messung irrelevanten unteren Teil des Bildes ist der bereits diskutierte Abbildungsfehler zu sehen.

Bei genauerer Betrachtung der Bilder scheint es, als ob beide Sphäroide in das Gel eingesunken wären. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die abgebildete Position über

die Laufzeitdifferenz und damit über die zurückgelegte optische Weglänge bestimmt wird (vgl. Abschnitt 5.2 über Keil aus Farbfilter). Aufgrund des starken lateralen Gradienten der optischen Weglänge oberhalb der Agarose wird die Oberfläche des Gels nicht als Gerade abgebildet.

Weder aus dem OCT-Tomogramm 5.5.1(a) noch aus dem *HSV*-Graphen 5.5.1(b) lässt sich schließen, welches der beiden Sphäroide angefärbt wurde. Betrachtet man die in Abbildung 5.5.2 dargestellte orts aufgelöste Frequenzanalyse der Interferenzdaten, so kann auch hier keine Anfärbung festgestellt werden.



(a) Orts aufgelöste Falschfarbendarstellung der Schwerpunktsfrequenz (b) Orts aufgelöste Falschfarbendarstellung der Bandbreite der Autokorrelation

Abbildung 5.5.2: Orts aufgelöste Falschfarbendarstellung des im Frequenzbereich ausgewerteten Interferenzsignals zweier Sphäroide (RT4) auf Agarosegel aus Abbildung 5.5.1

In Abbildung 5.5.2(a) und (b) sind beide spektroskopische Maße, Schwerpunktsfrequenz und Bandbreite der Autokorrelation respektive, in Tomogrammen (*H*-Graphen in der SOCT) mit einer Farbskala dargestellt. Für die Frequenzanalyse betrug die Breite des Hanning-Fensters in der CZT von 160 bis 220 kHz 256 Punkte (9,2 µm in Luft). Das Fenster wurde in Schritten von 2 µm (56 Punkten) mit dem Interferenzsignal multipliziert.

Während in 5.5.2(b) die Sphäroide vom Hintergrund aber nicht vom Agarosegel unterschieden werden können, ist diese Differenzierung in (a) ansatzweise möglich. Die Sphäroide scheinen eine etwas höhere Rotverschiebung als die Agarose zu besitzen.

Eine Berechnung der mittleren Verschiebung des Frequenzschwerpunktes dreier ausgewählter Teilbereiche (0 µm bis 350 µm; 350 µm bis 550 µm; 550 µm bis 1100 µm) als Funktion der Eindringtiefe ist in Abbildung 5.5.3 wiedergegeben. Dazu wurden die Frequenzdaten über die A-Scans aus Abbildung 5.5.2(a) aus den drei Teilbereichen jeweils gemittelt.

Auf den ersten hundert Mikrometern ist das Hintergrundrauschen bei einer Mittenfrequenz von etwa 189 kHz zu sehen. Dieser liegt wie durch das Frequenzintervall der CZT (160 kHz-220 kHz) festgelegt in der Mitte dieser Spanne.

Zwischen 200 μm und 400 μm sind die leicht in der Tiefe versetzten Sphäroide durch das lokale Minimum der roten und blauen Kurve gekennzeichnet. Ab einer Tiefe von 400 μm ist das Agarosegel durch den nahezu tiefenabhängigen linearen Verlauf der Schwerpunktsfrequenz in allen drei Kurven klar zu erkennen. Die Sprünge der Verschiebung in den Kurven fallen mit dem Abbildungsfehler in einer Tiefe von etwa 800 μm zusammen. Die Frequenzschwerpunkte sind im Fall beider Sphäroide aufgrund der schwächeren Streuung unterhalb der Zellagglomerate zum blauen hin verschoben. Der Verlauf der grünen Kurve hebt sich in diesem Bereich von beiden Kurven ab und fällt durch seine mit der Tiefe zunehmende Rotverschiebung auf. Da die Rückstreuung des Agarosegels zwischen den Sphäroiden sehr viel stärker ausgeprägt ist als unterhalb der Sphäroide und sogar mit zunehmender Tiefe steigt, kann die Rotverschiebung dadurch erklärt werden. Die Frequenzschwerpunkte des Agarosegels und der Sphäroide erreichen in den Tiefen, in denen die zurückgestreute Intensität vergleichbar ist, in etwa den gleichen Wert. Dieser liegt bei 183 kHz, der Schwerpunktsfrequenz des Laserspektrums. Eine farbstoffinduzierte Rotverschiebung kann in diesem Fall also ausgeschlossen werden.

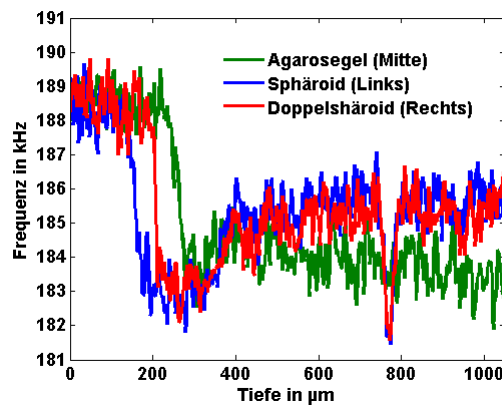


Abbildung 5.5.3: Mittlere Verschiebung des Frequenzschwerpunktes für das Sphäroid, das Agarosegel und das Doppelsphäroid als Funktion der Eindringtiefe aus Abbildung 5.5.2(a)

Mit dieser Untersuchung des Frequenzschwerpunktes ist gezeigt worden, dass keine Anfärbung des Sphäroids erfolgt ist. Für diesen Befund müssen zwei unterschiedliche Ursachen in Betracht gezogen werden.

1. Der Farbstoff durchdringt nicht das Gewebe.
2. Der Farbstoff wird bereits vor der Aufnahme durch die Lichtquelle ausgebleicht.

Um festzustellen, ob das Einbringen des Farbstoffes in den Zellverband überhaupt möglich ist, wurde im Folgenden ein Sphäroid der weniger dicht gepackten Zellreihe J82 in eine Farbstofflösung höherer Konzentration (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Farbstoff in DMSO) eingetaucht. Außerdem wurde die Einwirkzeit auf dreißig Minuten verdreifacht und es wurde bei der Messung darauf geachtet, dass das Sphäroid dem Laserstrahl nur die für einen B-Scan benötigte Zeit ausgesetzt war. Mit Hilfe eines Teleskops wurde im Vorfeld eine für den B-Scan relevante Schnittebene ausgewählt, welche außerhalb des Sphäroids aber parallel zu der Ebene verläuft, die den Scheitelpunkt des Zellagglomerates schneidet. Für eine Messung wurde dann das Sphäroid kurzfristig in den Strahlengang geschoben.

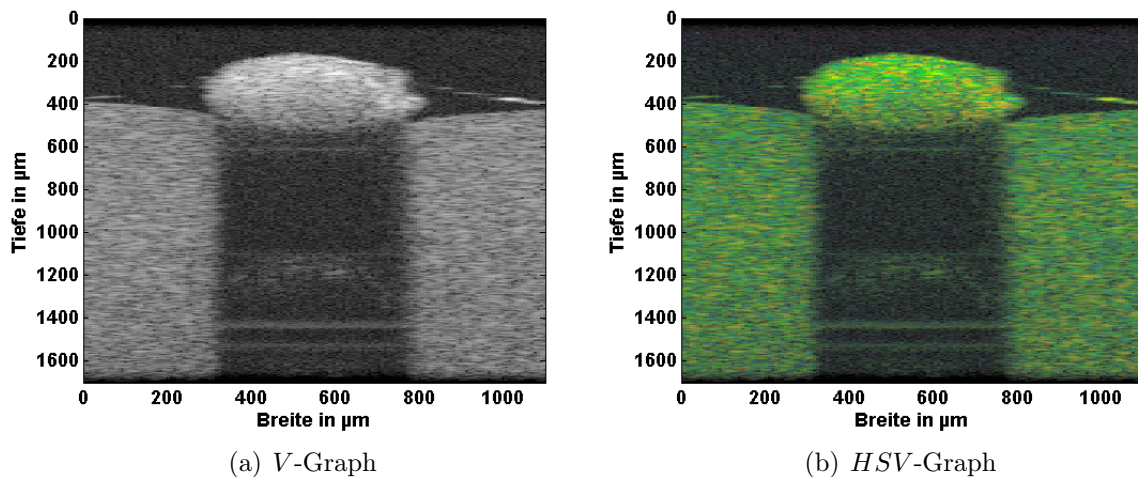


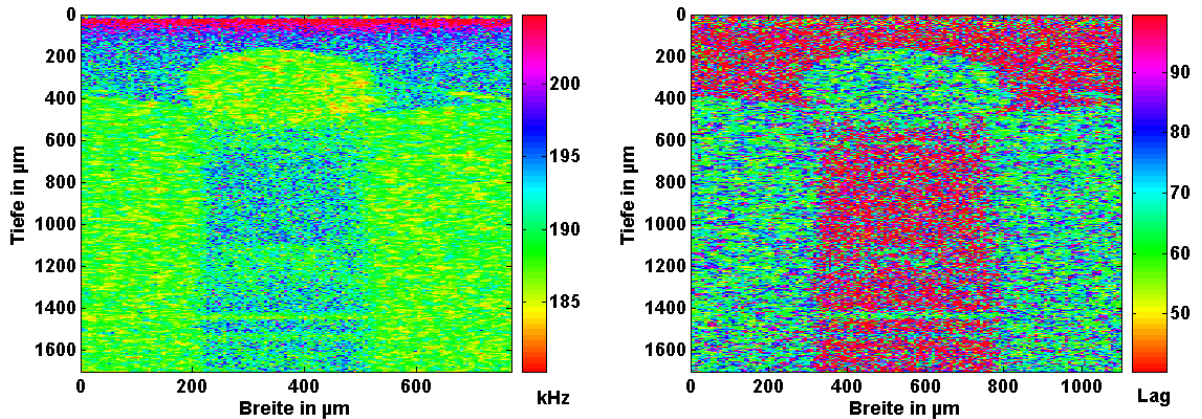
Abbildung 5.5.4: **OCT- und SOCT-Tomogramm eines angefärbten Sphäroids (J82) auf Agarosegel**

In Abbildung 5.5.4 sind die OCT- und SOCT-Tomogramme des angefärbten Sphäroids in einer Tiefe von 200 μm bis 500 μm zu sehen. Auch hier wurde der Frequenzschwerpunkt aufgrund des besseren spektroskopischen Kontrastes als farbtongebender *H*-Graph im *HSV*-Graphen gewählt. Das auf dem Agarosegel mittig liegende Sphäroid scheint wie im vorherigen Experiment in das Gel eingesunken zu sein. Es weist am rechten Rand eine porös wirkende Stelle auf. Im für die Messung irrelevanten unteren Teil des Bildes sind die bereits diskutierten Abbildungsfehler zu sehen.

Es ist auffällig, dass die Oberfläche des Gels über die Ausdehnung des Zellhaufens hinaus eine Krümmung zum Seitenrand des Bildes aufzeigt. Diese vermeintliche Krümmung wird durch eine auf dem Agarosegel liegende Flüssigkeit verursacht, die sich an den Rändern des Gewebeverbandes durch Adhäsionskraft empor gesaugt hat. Das kann anhand der über dem Gel zu sehende Reflexion nachvollzogen werden. Die Intensität dieser Kurve steigt zum Randbereich hin an, da durch den steigenden Winkel zwischen Flüssigkeitsoberfläche und einfallendem Lichtstrahl die zurückgestreute bzw. reflektierte Lichtmenge zunimmt. Diese Flüssigkeit besteht aus Resten der Farbstofflösung, in der das Sphäroid einlegt war und die aus technischen Gründen nicht immer vollständig

entfernt werden können.

Bereits im OCT-Tomogramm deutet sich eine Färbung durch den Intensitätsunterschied zwischen der Ober- und Unterseite des Sphäroids an, welche so im vorherigen Versuch nicht beobachtet wurde. Betrachtet man in Abbildung 5.5.4(b) den SOCT-Graphen, so kann eine stärkere rote Färbung im unteren Abschnitt des Sphäroids bemerkt werden, welche sich gegen die angrenzenden Kanten des Gels leicht absetzt. Diese Rotverschiebung kommt allerdings nicht eindeutig zur Geltung, da die Agarose auch eine leichte rötliche Färbung aufweist. Der Unterschied kommt erst bei der Betrachtung des farbtonegebenden Graphen in Abbildung 5.5.5 zum Vorschein.



(a) Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Schwerpunktsfrequenz (b) Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung der Bandbreite der Autokorrelation

Abbildung 5.5.5: Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung des im Frequenzbereich ausgewerteten Interferenzsignals eines Sphäroids (J82) auf Agarosegel aus Abbildung 5.5.4

In Abbildung 5.5.5(a) und (b) sind beide spektroskopischen Maße, Schwerpunktsfrequenz und Bandbreite der Autokorrelation, in Tomogrammen (H -Graphen in der SOCT) mit einer Farbskala dargestellt. Für die Frequenzanalyse betrug die Breite des Hanning-Fensters in der CZT von 160 bis 220 kHz 256 Punkte (9,2 μm in Luft). Das Fenster wurde in Schritten von 2 μm (56 Punkten) mit dem Interferenzsignal multipliziert.

Aus der Bandbreite der Autokorrelation in Abbildung 5.5.5(b) kann lediglich der Hintergrund vom Gewebe unterschieden werden, während aus Abbildung 5.5.5(a) ein Unterschied zwischen Agarosegel und Sphäroid im Frequenzschwerpunkt festgestellt werden kann. Es ist dadurch davon auszugehen, dass der Farbstoff in das Sphäroid eingedrungen ist. Dieser Eindruck wird durch die Beobachtung gefestigt, dass insbesondere die Randbereiche, in denen die höchste Konzentration zu erwarten ist, die größte Rotverschiebung aufweisen. Selbst in den obersten Zellschichten des Sphäroids ist eine deutliche Färbung zu beobachten. Dass der rechte Rand stärker gefärbt ist als der linke Rand, mag mit dem strukturellen Unterschied beider Seiten zusammenhängen.

Der im oberen Bildrand zu beobachtende rote Streifen ist ein Artefakt, welches durch den starken Geschwindigkeitsabfall des Referenzspiegels erklärt werden kann und genau dann auftritt, wenn das Messfenster zu weit in Richtung der Umkehrpunkte der Referenzarmspiegelauslenkung positioniert wird. In der Geschwindigkeitskorrektur kommt es dann bei zu großen Abweichungen von der mittleren Geschwindigkeit zu Singularitäten im Randbereich.

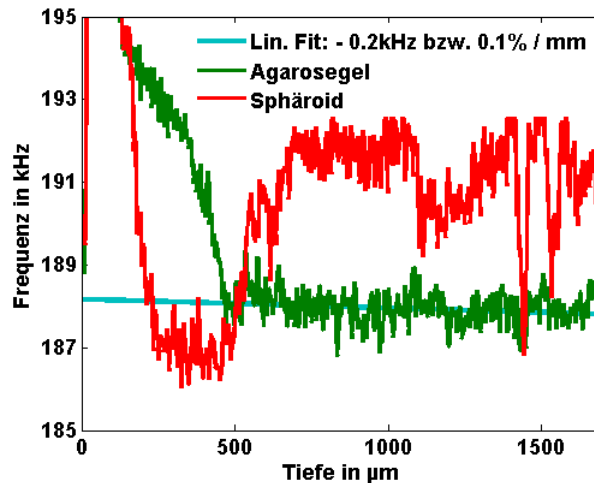


Abbildung 5.5.6: Mittlere Verschiebung des Frequenzschwerpunktes für das Sphäroid der Zellreihe J82 und das Agarosegel als Funktion der Eindringtiefe aus Abbildung 5.5.5(a)

In Abbildung 5.5.6 ist die quantitative Auswertung des mittleren Frequenzschwerpunktes als Funktion der Eindringtiefe für das Agarosegel und das Sphäroid separat aufgetragen. Hierfür wurden die Frequenzdaten der A-Scans aus Abbildung 5.5.5 bei einer Breite von ca. $300\ \mu\text{m}$ und $800\ \mu\text{m}$ geteilt und für den Bereich des Gels und des Sphäroids gemittelt. Mittels linearer Regression wurden eine Geraden als Maß der Verschiebung für die gemittelten Frequenzschwerpunkte der grünen Kurve zwischen $400\ \mu\text{m}$ und $1400\ \mu\text{m}$ berechnet.

Der Verlauf der grünen, für die Frequenzverschiebung des Agarosegels repräsentative Kurve beginnt oberhalb von $195\ \text{kHz}$ und fällt beim Übergang von Luft auf das Agarosegel bei einer Tiefe von etwa $500\ \mu\text{m}$ auf den Wert der Schwerpunktsfrequenz des Laserspektrums, hier ca. $188\ \text{kHz}$. Der Verlauf der roten, auf die Frequenzverschiebung des Sphäroids bezogene Kurve beginnt ebenfalls jenseits von $195\ \text{kHz}$. Sie fällt dann ab einer Tiefe von $200\ \mu\text{m}$ steil ab und erreicht zwischen $300\ \mu\text{m}$ und $500\ \mu\text{m}$ einen Wert von $187\ \text{kHz}$. Unterhalb dieser Tiefe steigt der Frequenzschwerpunkt wieder auf etwa $192\ \text{kHz}$, wo er nahezu konstant verharrt.

Der Hintergrund ist aufgrund der diskutierten Singularität nicht entsprechend des CZT-Intervalls bei $190\ \text{kHz}$ anzutreffen. Die lineare Regression der grünen Kurve zeigt, dass die Verschiebung ab einer Tiefe von $400\ \mu\text{m}$ kleiner ist als $0,1\%$ pro Millimeter. Dies

spricht gegen eine potentielle farbstoffinduzierte Verschiebung, die durch eine Diffusion des Farbstoffes in das Gel verursacht worden sein könnte. Die Sprünge der Verschiebung in der roten Kurve fallen mit Abbildungsfehlern unterhalb von $600\ \mu\text{m}$ zusammen. Dass sich die Verschiebung des Sphäroids – zu sehen in der roten Kurve zwischen $200\ \mu\text{m}$ und $500\ \mu\text{m}$ – signifikant vom Rot der Agarose neben dem Sphäroid abhebt, kann als erster erfolgreicher Versuch einer Anfärbung von Gewebe der Zelllinie J82 interpretiert werden. Selbst ein genauer Vergleich der Färbung des Sphäroids im Bereich von $400\ \mu\text{m}$ bis $500\ \mu\text{m}$ mit der durchschnittlichen Schwerpunktsfrequenz des Gels in einem Bereich, in dem die zurückgestreute Intensität nahezu identisch ist, zeigt eine eindeutige Rotverschiebung des Sphäroids gegenüber dem Gel.

In diesem Versuch wurde gezeigt, dass eine Anfärbung des Gewebeverbandes durch die Vergrößerung der Zellzwischenräume und eine Verringerung der Zeit, in der das Sphäroid dem Laserstrahl ausgesetzt ist, erzielt werden kann. Die asymmetrische Färbung des Sphäroids (vgl. Abbildung 5.5.5(a)) weist darauf hin, dass die Vergrößerung der Zellzwischenräume die notwendige Bedingung für eine Anfärbung ist, womit sich auch der Ausgang des vorherigen Experiments erklären lässt.

Wie aus Abbildung 5.5.4(b) ersichtlich ist, reicht die Stärke der Färbung jedoch nicht aus, um sie als Kontraststeigerung in einem *HSV*-Graphen zu erkennen. Zu diesem Zweck wurde ein weiterer Versuch unternommen, der das Eindringen höherer Farbstoffkonzentrationen in den Zellverband sicherstellen soll. Da bekannt ist, dass die Packungsdichte, sprich das Maß der reziproken Zellzwischenräume, im Alterungsprozess abnimmt, wurden im nächsten Schritt gealterte Sphäroide, hier aus der Zelllinie RT4, für 45 Minuten in eine Farbstofflösung mit einer Konzentration von $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ gegeben. Bis auf eine kurz vor der Messung durchgeführte Spülung der auf dem Gel sitzenden Sphäroide mit einer NaCl -Lösung wurden die Durchführung und die Messparameter aus der letzten Messung beibehalten.

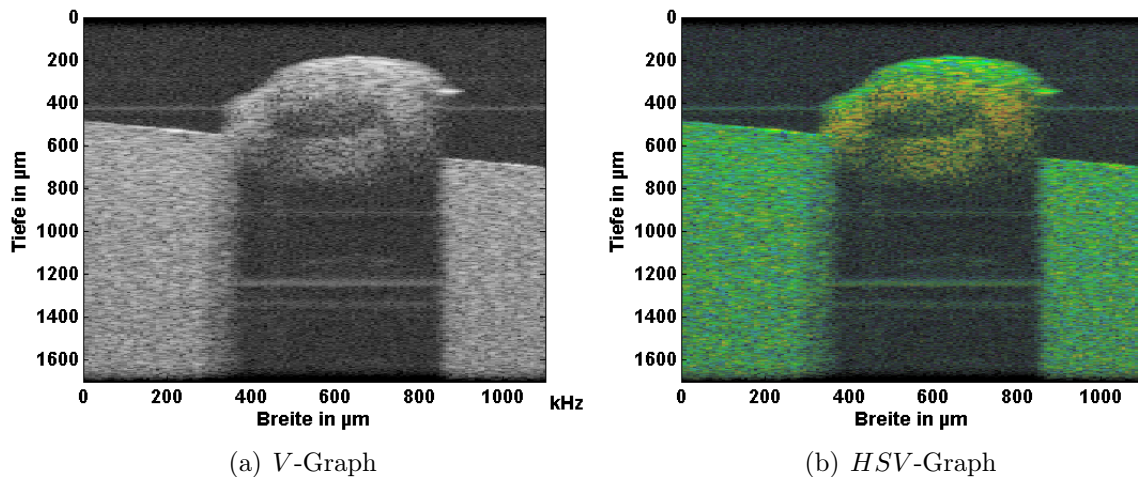


Abbildung 5.5.7: **OCT- und SOCT-Tomogramm eines angefärbten und gealterten Sphäroids (RT4) auf Agarosegel**

In Abbildung 5.5.7 ist das OCT- und SOCT-Tomogramm des angefärbten Sphäroids zu sehen, dass in der Mitte des Bildes auf dem Agarosegel liegt. Im Mittelpunkt des Gewebeverbands kann ein für ältere Sphäroide charakteristischer Hohlraum identifiziert werden. Dieser entsteht im Alterungsprozess, welcher maßgeblich von Innen nach Außen erfolgt. Beim Vergleich von Abbildung 5.5.7(a) und (b) fällt die starke Rotfärbung im Inneren des Sphäroids sofort auf. Sie kann im Folgenden eindeutig auf das Wirken des Farbstoffes zurückgeführt werden. Hier kann zum ersten Mal von einer deutlichen Kontraststeigerung durch den Einsatz eines NIR-Farbstoffes und die Frequenzanalyse des Interferenzsignals gesprochen werden.

Geht man davon aus, dass der Farbstoff durch eine Lockerung des Zellverbands in die weniger dicht gepackten Zellzwischenräume gelangt ist und dort durch seine hohe Konzentration zu einer nahezu lokalen Rotverschiebung führt, so kann man im Vergleich zu Abbildung 5.5.7(a) in 5.5.7(b) das unterschiedlich dicht gepackte Gewebe besser voneinander differenzieren. Sowohl der Hohlraum als auch die Durchbrüche des Hohlraums zum Gel im rechten und linken unteren Teil der Kugel heben sich stärker als in 5.5.7(a) vom Hintergrund ab. Der Auflagepunkt des Gewebes auf dem Gel kann in 5.5.7(b) mit höherer Genauigkeit identifiziert werden. Der obere Teil des Sphäroids hebt sich durch die distinkte Grünfärbung wesentlich von den darunterliegenden Bereichen ab. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für dieses Erscheinungsbild.

1. Es ist nicht genug Farbstoff in diesen Teil des Sphäroids eingedrungen, um eine instantane Rotverschiebung hervorzurufen, was ein Indiz dafür wäre, dass der Farbstoff hauptsächlich durch die Zellzwischenräume transportiert wird.
2. Es ist ausreichend Farbstoff in diesen Teil transportiert worden, doch wurde dieser bei der Spülung mit der NaCl-Lösung teilweise bis vollständig entfernt, was wiederum auch gegen ein Eindringen des Farbstoffmoleküls in die Zellen spräche.

Beide Möglichkeiten sprechen für eine starke Abhängigkeit der Eindringtiefe vom intrazellulären Abstand. Die in Abbildung 5.5.8 gezeigten Darstellungen der ortsbezogenen spektralen Information können zur weiteren Analyse herangezogen werden.

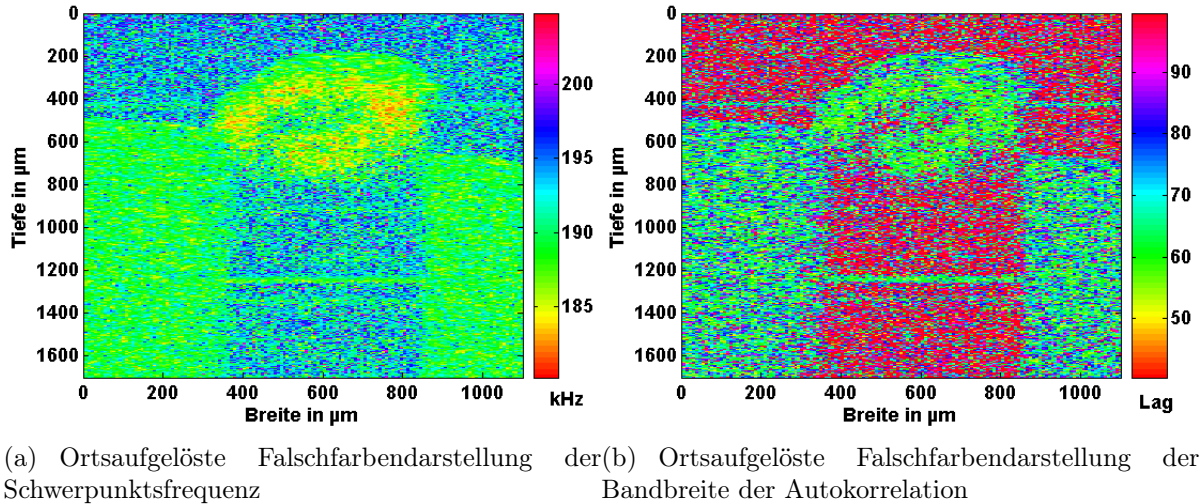


Abbildung 5.5.8: Ortsaufgelöste Falschfarbendarstellung des im Frequenzbereich ausgewerteten Interferenzsignals des gealterten Sphäroids (RT4) auf Agarosegel aus Abbildung 5.5.7

In Abbildung 5.5.8(a) und (b) sind beide spektroskopische Maße, Schwerpunktffrequenz und Bandbreite der Autokorrelation, in Tomogrammen (H -Graphen in der SOCT) mit einer Farbskala dargestellt. In beiden Tomogrammen lassen sich die Sphäroide durch eine Änderung im spektroskopischen Maß sowohl vom Hintergrund als auch vom Agarosegel differenzieren.

In Abbildung 5.5.8(a) wird die Anfärbung des unteren, porösen Teils des Sphäroids im frequenzraumbezogenen Graphen durch die Rotverschiebung bezüglich des oberen Teils des Sphäroids deutlich. Dieser äquidistante Streifen im zur Luft gewandten Kugelausschnitt des Sphäroids weist keinen Farbstoff auf. Der genaue Hintergrund muss allerdings noch untersucht werden. Weiterhin fällt auf, dass die rechte Seite im Vergleich zur gegenüberliegenden Seite eine stärkere Rotverschiebung aufweist. Dies kann mit dem strukturellen Unterschied beider Seiten erklärt werden und weist weiter darauf hin, dass der Farbstoff hauptsächlich durch die Zellzwischenräume ins Gewebe gelangt.

In Abbildung 5.5.8(b) ist im Vergleich zu den vorherigen Versuchen ein Kontrast im bandbreitenbezogenen Maß feststellbar. Es ist zum ersten Mal möglich das Sphäroid vom Agarosegel anhand eines Unterschiedes in der Bandbreite der Autokorrelation auseinander zu halten. Eine markante Reduktion der Bandbreite im unteren rechten Drittel weist auf eine niedrige Dichte des Gewebes hin. Dies bedeutet konsequenterweise, dass die Verschiedenheit des Gewebes bzw. die optische Bandbreite, wie in den vorherigen Experimenten bereits angedeutet wurde, bis zu diesem Versuch nicht ausgereicht hat, um dieses Maß zur spektroskopischen Kontraststeigerung zu verwenden.

Durch die separate Auswertung der Verschiebung des mittleren Frequenzschwerpunktes für das Sphäroid und das anliegende Agarosegel, welche als Funktion der Eindringtiefe in Abbildung 5.5.9 dargestellt sind, lassen sich weitere Schlussfolgerungen ziehen.

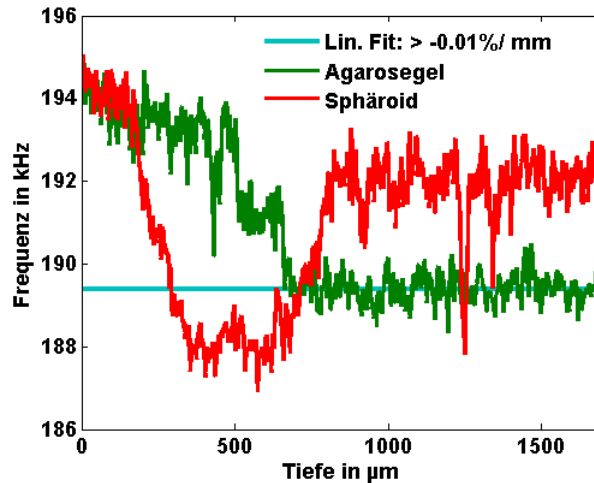


Abbildung 5.5.9: Mittlere Verschiebung des Frequenzschwerpunktes für das gealterte Sphäroid der Zellreihe RT4 und das Agarosegel als Funktion der Eindringtiefe aus Abbildung 5.5.8(a)

In Abbildung 5.5.9 ist die quantitative Auswertung des mittleren Frequenzschwerpunktes als Funktion der Eindringtiefe für das Agarosegel und das Sphäroid separat aufgetragen. Hierfür wurden die Frequenzdaten der A-Scans aus Abbildung 5.5.8(a) bei einer Breite von ca. $350\ \mu\text{m}$ und $850\ \mu\text{m}$ geteilt und für den Bereich des Gels und des Sphäroids gemittelt. Mittels linearer Regression wurde eine Gerade als Maß der Verschiebung für die gemittelten Frequenzschwerpunkte der grünen Kurve zwischen $700\ \mu\text{m}$ und $1700\ \mu\text{m}$ berechnet.

Der Verlauf der grünen, für die Frequenzverschiebung des Agarosegels repräsentative Kurve beginnt beim Hintergrund von $194,5\ \text{kHz}$ und fällt beim Übergang von Luft auf das Agarosegel bei einer Tiefe von etwa $500\ \mu\text{m}$ auf den Wert der Schwerpunktsfrequenz des Laserspektrums, hier ca. $189\ \text{kHz}$. Der Verlauf der roten, auf die Frequenzverschiebung des Sphäroiden bezogene Kurve beginnt ebenfalls auf Höhe des Hintergrundes. Sie fällt dann ab einer Tiefe von $100\ \mu\text{m}$ steil ab, bis zwischen $400\ \mu\text{m}$ und $600\ \mu\text{m}$ ein Wert von $188\ \text{kHz}$ erreicht worden ist, um dann darüber hinaus wieder auf $192\ \text{kHz}$ zu steigen.

Die Silhouette des Sphäroids kann anhand der roten Kurve in einer Tiefe von etwa $200\ \mu\text{m}$ bis $800\ \mu\text{m}$ nachvollzogen werden. Selbst der Hohlraum kann durch eine leichte Blauverschiebung bei etwa $500\ \mu\text{m}$ identifiziert werden. Jenseits der $800\ \mu\text{m}$ ist die rote Kurve in Relation zum Hintergrund bei etwa $194,5\ \text{kHz}$ zum Roten hin verschoben. Die blauen Anteile des Rauschens werden bei Penetration des angefärbten Sphäroids durch den Farbstoff absorbiert. Die Peaks in einer Tiefe von etwa $1,3\ \text{mm}$ und $1,4\ \text{mm}$ sind

eindeutig auf die Abbildungsfehler zurückzuführen. Die grüne Kurve ist in Höhe des Sphäroids auch rotverschoben, weil der zu mittelnende Ausschnitt nicht weit genug entfernt vom Sphäroid gewählt worden ist. Die Stufe zwischen $500\ \mu\text{m}$ und $700\ \mu\text{m}$ kann durch das im Gel vorhandene laterale Gefälle der Oberfläche gut erklärt werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass unterhalb von $700\ \mu\text{m}$ Tiefe keine noch so kleine Verschiebung festgestellt werden kann. Da das Gel auf den Tomogrammen einen homogenen Eindruck macht, kann das bedeuten, dass eine Rotverschiebung durch Rayleigh-Streuung im Gel auszuschließen ist, so dass die Verschiebungen in den oben gezeigten Fällen nur durch Inhomogenitäten des Gels und den Farbstoff verursacht worden sind. Zum Einen erhöht es die Wahrscheinlichkeit, dass eine Diffusion des Farbstoffes im Fall der untersuchten nebeneinander liegenden Agarosegelwürfel stattgefunden hat. Zum Anderen unterstreicht es die Empfindlichkeit des Maßes bezüglich der Rückstreuung im Gewebe. Da die zurückgestreute Lichtmenge bekannt ist, könnte sie mit dem Frequenzschwerpunkt zu einem neuen spektroskopischen Maß verrechnet werden, das die Absorption stärker von der Rückstreuung separiert, was zu einer Erhöhung der zu extrahierenden Information und gleichzeitig zu einer Steigerung des Kontrastes führen würde. Eine genauere Untersuchung des Agarosegels in Verbindung mit NIR-Farbstoffen wäre nicht nur aufschlussreich, sondern in Bezug auf eine Kontraststeigerung sehr vielversprechend.

Abschließend soll mit drei zueinander versetzten und angefärbten Sphäroiden in Abbildung 5.5.10 gezeigt werden, dass die erreichte Kontraststeigerung nicht nur reproduzierbar ist, sondern auch auf relativ kleinen optischen Weglängen und in weniger porösem Gewebe zu realisieren ist.

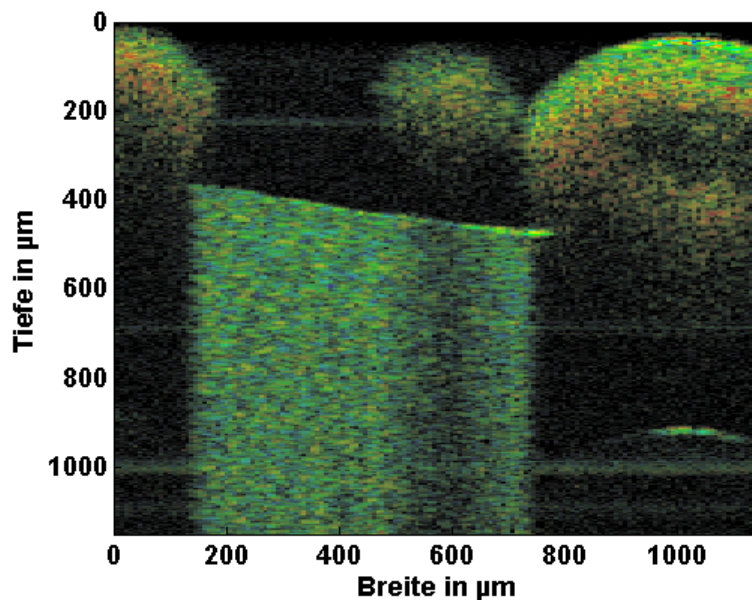


Abbildung 5.5.10: SOCT-Tomogramm dreier angefärbter und gealterter Sphäroide (RT4) auf Agarosegel

In dieser Versuchsreihe wurde demonstriert, dass eine Anfärbung von Gewebe mit NIR-Farbstoffen, das aus zwei verschiedenen Zelllinien (J82 und RT4) kultiviert wurde, möglich ist. Die Injektion des Farbstoffes ins Gewebe stellt bisweilen die größte Herausforderung dar. Eine Variation der Packungsdichte der eingesetzten Sphäroide zeigt, dass der Farbstofftransport hauptsächlich durch die Zellzwischenräume erfolgt. Möglicherweise verhindert die Größe des Farbstoffmoleküls sein Eindringen durch die Zellwand in die Zelle und erschwert die Bewegung durch die Zellzwischenräume. Das hätte zur Folge, dass eine antikörpergebundene gewebespezifische Markierung, welche eine Vergrößerung des Farbstoffmoleküls mit sich bringt, verkompliziert würde.

Eine genaue Analyse der Schwerpunktsverschiebung zeigt, dass in Analogie zum bandbreitenbezogenen Maß eine präzise Interpretation notwendig ist, damit zum Einen Absorptions- und Rückstreuungseigenschaften des Gewebes exakt wiedergegeben werden können und zum Anderen von einer tatsächlichen Kontraststeigerung ausgegangen werden kann. Eine Steigerung der optischen Bandbreite ist diesbezüglich unverzichtbar. Nichtsdestotrotz wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von NIR-Farbstoffen am Gewebe eine signifikante Kontraststeigerung zu erreichen ist. Darüberhinaus wurden Ansätze aufgezeigt, welche dazu genutzt werden können, Rückstreu- und Absorptionsverhalten präziser zu differenzieren.

Genauere Untersuchungen des Farbstoffes und der einzusetzenden Farbstoffkonzentration in Kombination verschiedener Gewebetypen und -dichten müssen durchgeführt werden, damit nicht nur eine dem Gewebe entsprechende Farbstoffkonzentration ermittelt wird, sondern auch der Transportmechanismus des Farbstoffes im Gewebe hinsichtlich einer gewebespezifischen Anfärbung verstanden werden kann.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Obwohl sich die OCT durch ihre hohe Empfindlichkeit auszeichnet, kann eine sichere Diagnostik aufgrund des relativ geringen Kontrastes verschiedener Gewebestrukturen nicht immer gewährleistet werden. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass eine Kontraststeigerung in der optischen Kohärenztomographie durch das Einbringen von NIR-Farbstoffen in unterschiedliche Gewebe in Kombination mit einer Frequenzanalyse der Interferenzdaten möglich ist. Dies zeigt, dass eine Unterscheidung verschiedener Gewebetypen durch farbstoffbasierte Marker erreicht werden kann.

Hierfür wurde zunächst ein freistrahlbasiertes OCT-System aufgebaut, welches den Einsatz hoher spektraler Bandbreiten über den gesamten für die OCT relevanten Wellenlängenbereich zulässt. Ein axiales Auflösungsvermögen von $3,5\ \mu\text{m}$, welches der theoretisch möglichen Auflösung entspricht, wurde durch eine effiziente Dispersionskompensation erreicht. Eine Optimierung der Strahlteilverhältnisse und der Einsatz von Maßnahmen zur optischen und elektronischen Rauschunterdrückung haben dazu beigetragen, dass eine hohe Empfindlichkeit von 104 dB im OCT-System erzielt wurde. Mechanische, elektronische und digitale Methoden zur Linearisierung der Referenzspiegelgeschwindigkeit wurden erarbeitet. Dadurch ist eine Steigerung des spektroskopischen Kontrastes bei den kleinsten, jemals in der SOCT eingesetzten optischen Bandbreiten (80 nm bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm) und bei den schnellsten in der SOCT verwendeten Repetitionsraten (30 Hz) ermöglicht worden [4].

Auf Grundlage der Chirp-Z-Transformation wurde eine effiziente, zeitaufgelöste Frequenzanalyse entwickelt, welche dazu genutzt wird, die für die Probe repräsentativen spektroskopischen Daten gleichzeitig zu den intensitätsbasierten Informationen in einem so genannten HSV-Graphen orts aufgelöst zu visualisieren. Dazu wurden zwei spektroskopische Maße eingeführt. Der Frequenzschwerpunkt der spektralen Leistungsdichte soll die absorptionsinduzierte Verschiebung des Frequenzschwerpunktes widerspiegeln, welche durch den Einsatz eines NIR-Farbstoffes verstärkt hervorgerufen wird. Die Bandbreite der Autokorrelation der spektralen Leistungsdichte soll hingegen die gewebespezifische Rückstreuung der Probe erfassen. Eine Änderung der Dichte, Größe und Verteilung der Streuzentren im Gewebe verursacht lokale Änderungen der Modulation der spektralen Leistungsdichte, so dass die Rückstreuung darüber quantifiziert werden kann.

Das Potential einer genauen Frequenzanalyse zur Kontraststeigerung wurde im ersten Schritt an einem Absorptionsfilter erfolgreich erprobt. Diese SOCT-Messungen konnten sowohl qualitativ als auch quantitativ mit den erwarteten Ergebnissen in Einklang gebracht werden.

Durch eine Messung, in welcher der NIR-Farbstoff DY-781 in Agarosegel eingebettet wurde, konnte eine farbstoffbedingte Kontraststeigerung durch die spektroskopische Analyse und eine entsprechende Darstellung des Interferenzsignals an einem einfachen Modell gezeigt werden. Eine quantitative Diskrepanz der spektroskopischen Daten zwischen der SOCT-Messung und dem erwarteten Resultat kann sowohl durch eine Diffusion des Farbstoffes in vorher nicht angefärbte Areale als auch durch das Ausbleichen des Farbstoffes erklärt werden.

Auch bei der Anfärbung eines pflanzlichen Präparates (Blattader des schwarzen Holunders) konnte eine Kontraststeigerung erzielt werden. Hier wurde verdeutlicht, dass die in dieser Arbeit untersuchten Maße zur Darstellung der spektroskopischen Information nicht einzig und allein von der Absorption oder der Rückstreuung in der Probe abhängig sind. Vielmehr ist eine vertiefte Interpretation der spektroskopischen Metrik notwendig, um die farbstoffinduzierte Kontraststeigerung zu interpretieren.

Eine eindeutige Kontraststeigerung durch die Anfärbung von Sphäroiden aus zwei verschiedenen Zelllinien (J82 und RT4) konnte durch eine spektroskopische Auswertung des Interferenzsignals und eine entsprechende Darstellung nachgewiesen werden. Durch die Variation der Einwirkzeit der Farbstofflösung und der Größe der Zellzwischenräume konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff hauptsächlich durch den intrazellulären Raum in das Gewebe gelangt.

Aus der Summe der Versuche wird deutlich, dass die Betrachtung des Frequenzschwerpunktes nicht nur die absorptionsbedingte Schwerpunktsverschiebung der spektralen Leistungsdichte wiedergibt. Es wird auch die Rückstreuung berücksichtigt, indem für niedrige Intensitäten der Hintergrund bzw. das Rauschen stärker in der Berechnung des Schwerpunktes gewichtet wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Bandbreite der Autokorrelation der spektralen Leistungsdichte gewebespezifische Unterschiede in der Dichte der Streuzentren aufzeigen kann. Dabei ist zu beachten, dass eine starke Absorption des Laserspektrums im Gewebe, wie z.B. beim Einsatz eines NIR-Farbstoffes, die zur Verfügung stehende optische Bandbreite reduziert.

6.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind vielversprechend und geben einen Einblick in die zukünftigen Anwendungsgebiete der spektroskopischen optischen Kohärenztomographie.

Hierbei hat sich gezeigt, dass eine Steigerung der genutzten Bandbreite der Lichtquelle notwendige Voraussetzung für eine über das hier vorgestellte Maß hinausgehende Kontraststeigerung mittels SOCT ist. Während die dafür notwendigen Maßnahmen beim Aufbau des SOCT-Systems bereits berücksichtigt wurden, steht eine geeignete breitbandigere Lichtquelle zum jetzigen Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Der Einsatz einer entsprechenden Lichtquelle wird für zukünftige Analysen angestrebt.

Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Ausbleichung des Farbstoffes und die Diffusionseigenschaften der Farbstofflösung im Gewebe genauer analysiert werden müssen. Dadurch wird nicht nur ein genaueres Verständnis der Absorptions- und Rückstreuungseigenschaften der gefärbten Probe ermöglicht, sondern auch ein Vergleich der theoretisch zu erwartenden spektralen Verschiebung mit den gemessenen Werten. Damit soll unter anderem eine präzisere Anpassung der Farbstoffkonzentration an das zu untersuchende Gewebe erreicht werden. Daran anknüpfend sollte eine detaillierte Untersuchung der Transportmechanismen des Farbstoffes hinsichtlich einer antikörpergebundenen, gewebespezifischen Markierung erfolgen.

Im Sinne einer Echtzeitanalyse der SOCT-Daten ist eine FPGA-Implementierung der vorgestellten Datennachverarbeitung bestehend aus Positionskorrektur und Frequenzanalyse denkbar. Diese kann durch die enge Kooperation mit dem EECS in Aussicht gestellt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, Puliafito C. A., and J. G. Fujimoto. Optical coherence tomography. *SCIENCE*, 254(5035):1178–1181, November 1991.
- [2] A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzenberger, and T. Lasser. Optical coherence tomography – principles and applications. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, 66:239–303, 2003.
- [3] Y. Pan, J. P. Lavelle, S. I. Bastacky, S. Meyers, G. Pirtskhalaishvili, M. L. Zeidel, and D. L. Farkas. Detection of tumorigenesis in rat bladders with optical coherence tomography. *MEDICAL PHYSICS*, 28(12):2432–2440, Dec 2001.
- [4] U. Morgner, W. Drexler, F. X. Kärtner, X. D. Li, C. Pitris, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto. Spectroscopic optical coherence tomography. *OPTICS LETTERS*, 25:111, 2000.
- [5] J. M. Schmitt. Optical coherence tomography (OCT): A review. *IEEE J. SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS*, 5:1205–1215, 1999.
- [6] P. H. Tomlins and R. K. Wang. Theory, developments and applications of optical coherence tomography. *JOURNAL OF PHYSICS D-APPLIED PHYSICS*, 38(15):2519–2535, August 2005.
- [7] M. Born and E. Wolf. *PRINCIPLES OF OPTICS -7TH ED.* Cambridge University Press, 2003.
- [8] T. Fuji, M. Miyata, S. Kawato, T. Hattori, and H. Nakatsuka. Linear propagation of light investigated with a white-light michelson interferometer. *JOURNAL OF THE OPTICAL SOCIETY OF AMERICA B-OPTICAL PHYSICS*, 14(5):1074–1078, May 1997.
- [9] Y. T. Pan, R. Birngruber, J. Rosperich, and R. Engelhardt. Low-coherence optical tomography in turbid tissue-theoretical-analysis. *APPLIED OPTICS*, 34(28):6564–6574, October 1995.
- [10] A. Vogel and V. Venugopalan. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *CHEMICAL REVIEWS*, 103(5):2079–2079, May 2003.
- [11] D. J. Faber, E. G. Mik, M. C. G. Aalders, and T. G. van Leeuwen. Light absorption of (oxy-)hemoglobin assessed by spectroscopic optical coherence tomography. *OPTICS LETTERS*, 28(16):1436–1438, August 2003.

- [12] J. Y. Xu, D.L. Marks, and S. A. Boppart. Near-infrared dyes as contrast-enhancing agents for spectroscopic optical coherence tomography. *OPTICS EXPRESS*, 29(14):1647–1649, Jul 2004.
- [13] B. Hermann, K. Bizheva, A. Unterhuber, B. Povazay, H. Sattmann, L. Schmetterer, A. F. Fercher, and W. Drexler. Precision of extracting absorption profiles from weakly scattering media with spectroscopic time-domain optical coherence tomography. *OPTICS EXPRESS*, 12(8):1677–1688, April 2004.
- [14] I. S. Saidi, S. L. Jacques, and F. K. Tittel. Mie and rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin. *APPLIED OPTICS*, 34:7410–7418, 1995.
- [15] L. T. Perelman, V. Backman, M. Wallace, G. Zonios, R. Manoharan, A. Nusrat, S. Shields, M. Seiler, C. Lima, T. Hamano, I. Itzkan, J. Van Dam, J. M. Crawford, and M. S. Feld. Observation of periodic fine structure in reflectance from biological tissue: A new technique for measuring nuclear size distribution. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, 80(3):627–630, January 1998.
- [16] C. Y. Xu, P. S. Carney, and S. A. Boppart. Wavelength-dependent scattering in spectroscopic optical coherence tomography. *OPTICS EXPRESS*, 13(14):5450–5462, July 2005.
- [17] D. C. Adler, T. H. Ko, P. R. Herz, and J. G. Fujimoto. Optical coherence tomography contrast enhancement using spectroscopic analysis with spectral autocorrelation. *OPTICS EXPRESS*, 12(22):5487–5501, November 2004.
- [18] J. M. Schmitt, S. H. Xiang, and K. M. Yung. Speckle in optical coherence tomography. *JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS*, 4(1):95–105, January 1999.
- [19] V. Backman, M. B. Wallace, L. T. Perelman, J. T. Arendt, R. Gurjar, M. G. Muller, Q. Zhang, G. Zonios, E. Kline, T. McGillican, S. Shapshay, T. Valdez, K. Badizadegan, J. M. Crawford, M. Fitzmaurice, S. Kabani, H. S. Levin, M. Seiler, R. R. Dasari, I. Itzkan, J. Van Dam, and M. S. Feld. Detection of preinvasive cancer cells. *NATURE*, 406(6791):35–36, July 2000.
- [20] C. Y. Xu, D. L. Marks, M. N. Do, and S. A. Boppart. Separation of absorption and scattering profiles in spectroscopic optical coherence tomography using a least-squares algorithm. *OPTICS EXPRESS*, 12(20):4790–4803, October 2004.
- [21] A. M. Rollins and J. I. Izatt. Optimal interferometer designs for optical coherence tomography. *OPTICS LETTERS*, 24:1484–1486, 1999.
- [22] A. G. Van Engen, S. A. Diddams, and T. S. Clement. Dispersion measurements of water with white-light interferometry. *APPLIED OPTICS*, 37(24):5679–5686, August 1998.
- [23] C. K. Hitzenberger, A. Baumgartner, and A. F. Fercher. Dispersion induced multiple signal peak splitting in partial coherence interferometry. *OPTICS COMMUNICATIONS*, 154:179–185, 1998.

- [24] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, R. Zawadzki, B. Karamata, and T. Lasser. Numerical dispersion compensation for partial coherence interferometry and optical coherence tomography. *OPTICS EXPRESS*, 9(12):610–615, December 2001.
- [25] C. Y. Xu, F. Kamalabadi, and S. A. Boppart. Comparative performance analysis of time-frequency distributions for spectroscopic optical coherence tomography. *APPLIED OPTICS*, 44(10):1813–1822, April 2005.
- [26] M. J. L. Landsman, G. Kwant, G.A. Mook, and W.G. Zijlstra. Light absorption properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY*, 40:575–583, 1976.
- [27] T. Storen, A. Simonsen, O. J. Lokberg, T. Lindmo, L. O. Svaasand, and A. Royset. Measurement of dye diffusion in agar gel by use of low-coherence interferometry. *OPTICS LETTERS*, 28(14):1215–1217, July 2003.
- [28] C. Erlichman and Tannock I. F. Growth and characterization of multicellular tumor spheroids of human bladder-carcinoma origin. *IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 22(8):449–456, August 1986.

7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zuerst bei meiner Familie und meiner Freundin Maria Wingers für die unverzichtbare und vielfältige Unterstützung bedanken, ohne die mein Studium nicht so erfolgreich möglich gewesen wäre. Bei allen Freunden und Kollegen will ich mich herzlich bedanken, die durch ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Persönlich möchte ich mich bedanken bei

- Herrn Prof. Dr. H. Kurz für die Möglichkeit, an seinem Institut diese interessante Diplomarbeit anzufertigen,
- Herr. Prof. Dr. Güntherodt für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens,
- Herrn Dr. M. Först für die freundliche Betreuung meiner Arbeit sowie für die Möglichkeit Fragen und Schwierigkeiten jederzeit zu diskutieren
- Herrn Dipl. Chem. Felix Spöler für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die Einführung in die sagenumwobene Welt der Optik und der optischen Kohärenztomographie, für seine große Hilfsbereitschaft im Labor und im Büro und dafür, dass er immer für Fragen und Diskussionen Zeit hatte
- meinen Kolleginnen und Kollegen der Optikgruppe am IHT, Herrn Dipl. Phys. Tobias Plötzing, der sowohl bei technischen als auch bei theoretischen Fragen immer einen großen Beitrag liefern konnte, Herrn Dipl. Ing. Stefan Kray für seinen ansteckenden Tatendrang und Wissbegierigkeit, Frau Dipl. Ing. Astrid Marchewka für ihre wertvollen und peniblen Korrekturen, Jaroslav Lazar für seine freundliche Unterstützung in der analogen Filtertechnik, und allen zusammen für die freundlichen Kaffeerunden, die immer wieder in einer fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussion gipfelten
- den Mitarbeitern der Urologie und der Pathologie des Universitätsklinikums Aachen, Dr. J. Bornemann und Barabara Hermes für die freundliche Unterstützung in der Präparierung der biologischen Proben
- den Mitarbeitern des EECS, Herrn Dipl. Ing. G. Kappen und Heinrich Lücken für ihre ausdauernde Unterstützung in der digitale Nachverarbeitung und für die FPGA-Programmierung
- und nicht zuletzt allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Halbleitertechnik, mit denen die Zusammenarbeit immer große Freude gemacht hat.