

Optische Kohärenzmikroskopie
für die Diagnose im Verdauungstrakt:
Simulation, Laborexperiment
und endoluminales Konzept

DISSERTATION

DER FAKULTÄT FÜR MATHEMATIK UND PHYSIK
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT ZU TÜBINGEN
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
VORGELEGT VON

MARKUS GEORGE
AUS KOBLENZ

2004

Tag der mündlichen Prüfung

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

28. Oktober 2004

Prof. Dr. rer. nat. Herbert Müther

Prof. Dr. rer. nat. Erich Pliet

Dr. rer. nat. habil. Ludger Schnieder

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse der Abbildungen, Tabellen und Symbole	V
Kurzfassung	XXIII
Abstract	XXV
1 Einleitung	1
1.1 Endoluminale Mikroskopie	2
1.1.1 Definition der endoluminalen Mikroskopie	3
1.1.2 Optische Eigenschaften von Gewebe	4
1.1.3 Verfahren für die endoluminale Mikroskopie	7
1.1.4 Ergebnisse fluoreszenzbasierter Verfahren	9
1.1.5 Sonden für die endoluminale Mikroskopie	10
1.2 Zielsetzung	11
2 Optische Kohärenzmikroskopie	13
2.1 Prinzip des konfokalen Mikroskops	13
2.1.1 Aufbau und Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops	14
2.1.2 Herleitung der lateralen, konfokalen Punktbildfunktion	15
2.1.3 Tiefenauflösung des konfokalen Mikroskops	19
2.2 Optische Kohärenztomographie und -mikroskopie	21
2.2.1 Gemeinsames, interferometrisches Meßprinzip	21
2.2.2 Optische Kohärenztomographie	25
2.2.3 Optische Kohärenzmikroskopie	27
2.2.4 Entwicklungsstand existierender Systeme	30
3 Laboraufbau eines optischen Kohärenzmikroskops	33
3.1 Aufbau und Charakterisierung der Komponenten	33
3.1.1 Strahlteiler, Detektor und Lichtquelle	33
3.1.2 Lichtwellenleiter und Polarisationsanpassung	37
3.1.3 Demodulation, Datenaufnahme und Bildberechnung	39
3.1.4 Konfokales Mikroskop mit Rasterverschiebetisch	39
3.1.5 Verzögerungsstrecke mit Phasenmodulation	45
3.1.6 Algorithmen für den praxisnahen Einsatz	47
3.2 Ergebnisse	54
3.2.1 Abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion	54

3.2.2	Abbildungsstörungen	58
3.2.3	Vermessung der Topologie von Oberflächen	60
3.2.4	Mutmaßliche Reduktion des Einflusses von Aberrationen	65
3.2.5	Tiefpaßfilterung zur Verringerung der Specklewirkung	66
3.2.6	Auswertung von Volumendatensätzen	66
3.2.7	Unterscheidung zwischen Platten- und Zylinderepithel	68
3.3	Diskussion	73
4	Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops	79
4.1	Mathematische Beschreibung der Simulation	79
4.1.1	Rasterbereich und Simulation der Bildaufnahme	80
4.1.2	Gewebemodell	80
4.1.3	Spektrale Energieverteilung der Lichtquelle	82
4.1.4	Konfokale axiale Punktbildfunktion	83
4.1.5	Mono- und polychromatische Interferenz	83
4.2	Objektphasenkorreliertes Streifenartefakt	87
4.2.1	Zusammenfassung der Problematik des Streifenartefakts	88
4.2.2	Eingrenzung der Ursache des Streifenartefakts	89
4.2.3	Experiment zur Generierung des Streifenartefakts	90
4.2.4	Reproduktion des Experiments mittels der Simulation	92
4.2.5	Theorie basierend auf Experiment und Simulation	95
4.2.6	Erklärung des Simulationsergebnisses mittels der Theorie	98
4.2.7	Anschauliche Begründung des Verhaltens der Maxima	101
4.2.8	Ergebnis	101
4.3	Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Simulation	102
4.4	Diskussion	103
5	Konzeption eines endoluminalen optischen Kohärenzmikroskops	107
5.1	Konsequenzen für künftige endoluminale Systeme	107
5.2	Aktuelle Weiterführung der Entwicklung	108
5.2.1	Konfokale Sonde für den endoluminalen Einsatz	108
5.2.2	Elektrooptische Phasenmodulation im Referenzarm	109
5.2.3	Detektion, Demodulation und Datenakquisition	110
5.3	Diskussion	111
6	Zusammenfassung und Ausblick	113
A	Ergänzungen zu theoretischen Fragestellungen	117
A.1	Interferenz partiell kohärenten Lichts	117
A.1.1	Formalismus für zeitlich partiell kohärentes Licht	117
A.1.2	Vereinfachung bei stationären Wellenfeldern	118
A.1.3	Anwendbarkeit bei der optischen Kohärenzmikroskopie	118
A.2	FOURIEROptik	119
A.2.1	Definition und Eigenschaften der FOURIERtransformation	119
A.2.2	Lineare optische Systeme	120
A.2.3	FRESNELnäherung und -transformation	120

A.2.4	FRAUNHOFERNäherung und -transformation	122
A.3	Berechnungen und Formeln	123
A.3.1	Normierung GAUSSförmiger spektraler Leistungsdichten	123
A.3.2	Verwendung eines Monomodenlichtwellenleiters	123
A.3.3	Monochromatische Interferenz	125
A.3.4	Spezielle FOURIERtransformationen	126
B	Ergänzungen zu experimentellen Fragestellungen	129
B.1	Laboraufbau	129
B.1.1	Leistungsbilanz im Interferometer	129
B.1.2	Positionsrückmeldungsregelung des Rasterverschiebetischs	130
B.1.3	Polarisationsgrad der Lichtquelle	130
B.1.4	Absolute Messung der Modulationsamplitude	133
B.1.5	Software zur Bedienung des optischen Kohärenzmikroskops	135
B.1.6	Detailansicht des Interferometers	138
B.2	Elektrooptische Phasenmodulation	139
B.2.1	Elektrooptischer Effekt	139
B.2.2	Modulatoren	140
B.2.3	Transversal betriebener Phasenmodulator	141
B.2.4	Serienschwingkreis zur Ansteuerung des Kristalls	142
B.2.5	Justagestrategie	144
B.2.6	Quasistatische Phasenmodulation und Seitenbänder	144
C	Medizinisches Umfeld	147
C.1	Anatomie der Hohlgane des Verdauungstrakts	147
C.2	Neubildungen	148
C.2.1	Prävalenz von Neubildungen der Verdauungsorgane	149
C.2.2	Neo-, Hyper-, Meta- und Dysplasien	150
C.2.3	Klassifikation epithelialer Tumore	150
C.3	Endoskopische Tumorerkennung	151
C.4	BARRETT-Ösophagus	152
	Literaturverzeichnis	155
	Danksagung	163

Abbildungsverzeichnis

1.1	Wechselwirkungen zwischen Photonen und Gewebe	4
1.2	Absorptionskoeffizient von Wasser	6
1.3	Brechungsindizes von Wasser und Zellbestandteilen	7
1.4	Vergleich zwischen Fluoreszenzmikroskopie und konventioneller Histologie	10
1.5	Extra- und intrakorporale Rastereinheit bei der endoluminalen Mikroskopie	11
2.1	Punktförmige und flächenhafte Beleuchtung und Detektion in der Mikroskopie	14
2.2	Konventionelles konfokales Rastermikroskop und seine Umsetzung mit Lichtwellenleitern	15
2.3	FOURIERoptisches Modell des konfokalen Mikroskops	17
2.4	Tiefenauflösung beim konfokalen Mikroskop	20
2.5	Gemeinsames, interferometrisches Detektionsprinzip bei optischer Kohärenztomographie und -mikroskopie	22
2.6	Optische Kohärenztomographie und -mikroskopie	26
2.7	Entstehung des zeitabhängigen Detektorsignals bei Phasenmodulation im MICHELSON-Interferometer	28
2.8	Besselfunktionen J_1 , J_2 und J_3	29
2.9	Abhängigkeit der Harmonischen \mathcal{H}_1 , \mathcal{H}_2 und \mathcal{H}_3 abhängig von Phasenlage und Modulationsamplitude	30
2.10	Probennetz für die Transmissionselektronenmikroskopie	31
3.1	Schematischer Aufbau des optischen Kohärenzmikroskops im Labor	34
3.2	Fotografische Abbildung des optischen Kohärenzmikroskops	35
3.3	Gemessene Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle	36
3.4	Polarisationsanpassung in Lichtwellenleitern	38
3.5	Piezoelektrisch betriebener Verschiebetisch mit konfokalem Mikroskop	40
3.6	Strahlengang des konfokalen Mikroskops im Laboraufbau	41
3.7	Einstellung des Abstandes zwischen Lichtwellenleiterende und Kollimator	42
3.8	Laterales Punktbild des konfokalen Mikroskops gemäß Raytracing.	43
3.9	Abschätzung der lateralen Auflösung aus Bilddaten	43
3.10	Kantenauflösung in schneller und langsamer Rasterrichtung	44
3.11	Verzögerungsstrecke im Referenzarm	45

3.12	Frequenzabhängige Amplitude und totale harmonische Verzerrung der Modulation	46
3.13	Immersionsbedingter Abgleich des Referenzarms	48
3.14	Abgleich der Referenzarmlänge	50
3.15	Abgleich der Referenzarmlänge bei defokussierter, starker Reflexion	50
3.16	Harmonische in Abhängigkeit der Modulationsamplitude	52
3.17	Einstellung der Modulationsamplitude	53
3.18	Axiale Punktbildfunktion als Funktion der Referenzarmlänge mit Hintergrund	55
3.19	Tiefenauflösung und Dynamik des optischen Kohärenzmikroskops	56
3.20	Abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion	57
3.21	Optische Kohärenzmikroskopie von Zwiebelzellen	59
3.22	Artefakte bei der optischen Kohärenzmikroskopie	60
3.23	Ösophagus des Schweins in Reflexions- und optischer Kohärenzmikroskopie	61
3.24	Erzeugung von Isophasenlinien aus den Phasen der Harmonischen	62
3.25	Erzeugung von Isophasenlinien aus den Beträgen der Harmonischen	63
3.26	Überlagerung von Phasen- und Bildinformation	64
3.27	Profilometrie einer beschädigten Spiegeloberfläche	65
3.28	Mutmaßliche Reduktion des Einflusses von Aberrationen	66
3.29	Tiefpaßfilter zur Verringerung von Speckles	67
3.30	Bildverbesserung durch Auswertung von Volumendatensätzen	68
3.31	Ortsraumbilder von Platten- und Zylinderepithel	70
3.32	Leistungsspektren der Ortsraumbilder von Platten- und Zylinderepithel	71
3.33	Mittlere, azimuthal gemittelte Leistungsspektren von Bildern der Epithelien von Ösophagus und Magen	72
4.1	Modellierung der spektralen Energieverteilung	84
4.2	Simulierte Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle	85
4.3	Streifenartefakt am Beispiel einer Deckglasunterseite	88
4.4	Messung des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts	91
4.5	Simulation des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts	93
4.6	Asymmetrie des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts	94
4.7	Simulation des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts im Fall von Defokussierung	94
4.8	Simulation ohne Intensitätsmodulation im Referenzarm	95
A.1	Ausbreitung	121
B.1	Dynamisches Verhalten des piezoelektrischen Rasterverschiebtisches	130
B.2	Polarisationsgrad und -richtung im Referenzarm	131
B.3	Polarisationsgrad und -richtung am Ausgang der Lichtquelle	132
B.4	Verzögerungsstrecke vor mechanischer Verbesserung	134
B.5	Umkehrfunktion zur absoluten Messung der Modulationsamplitude	134
B.6	Graphische Benutzeroberfläche der Software	136
B.7	Fotografische Abbildung des Interferometers	138

B.8	Ansteuerung des elektrooptischen Phasenmodulators	143
C.1	Anatomie der Hohlorgane des Verdauungstrakt	148

Tabellenverzeichnis

1.1	Absorptions- und Streukoeffizienten	5
2.1	Spektrale Eigenschaften verschiedener Lichtquellen	25
3.1	Berechnung des Parameters W zur Unterscheidung von Platten- und Zylinderepithel	72
B.1	Leistungsbilanz im Interferometer	129
B.2	Polarisationszustand in Quelle und Referenzarm	133
C.1	Todesursachen in Deutschland 1999	149
C.2	Tumorklassifikationssystem für <i>Staging</i> und <i>Grading</i>	151

Symbolverzeichnis

In die folgenden Verzeichnisse wurden alle relevanten Größen einbezogen. Die Ausnahmen erstrecken sich auch wenige Hilfsvariablen oder Parameter, die nur lokal zur Erläuterung eines Zusammenhangs herangezogen wurden.

Die verwendeten Operatoren, Relationen und Funktionen wurden in der Reihenfolge ihres Auftretens im Text aufgelistet. Dagegen sind die verwendeten physikalischen und mathematischen Größen jeweils alphabetisch nach den Symbolnamen unter Einbeziehung der Indizes geordnet. Griechische Buchstaben und andere nichtlateinische Zeichen werden entsprechend der lateinischen Transkription ihres ausgesprochenen Namens behandelt.

Für jeden Eintrag wird durch Angabe einer Abschnittsnummer und Seitenzahl auf eine Textstelle verwiesen. Diese Textstelle kennzeichnet in fast allen Fällen das erstmalige Auftreten des Symbols, ansonsten die Stelle mit der umfassendsten Definition.

Operatoren, Relationen und Funktionen

$\delta(x, y)$	zweidimensionale DIRACsche δ -Distribution	2.1.2	17
\otimes	Faltungsoperator	2.1.2	17
\sim	proportional	2.1.3	20
$J_i(\varphi)$	i -te BESSEL- J -Funktion an der Stelle φ	2.2.3	28
$a \perp b$	Restwert der Ganzzahldivision a/b	3.1.6	51
$\lfloor a \rfloor$	größte ganze Zahl, die kleiner oder gleich a ist	4.1.2	81
$\lceil a \rceil$	kleinste ganze Zahl, die größer oder gleich a ist	4.1.2	81
\mathcal{F}	FOURIERtransformation	A.2.1	119
\mathcal{F}^{-1}	FOURIERrücktransformation	A.2.1	119
A^T	Transponierte der Matrix A	B.2.3	141

Physikalische und mathematische Größen

A_0	Skalierungsfaktor einer monochromatischen Amplitude $A_k(t)$, Normierung erfolgt stets auf $A_0 = 1$	2.2.1	23
α	Öffnungswinkel einer kreisförmigen Apertur	2.1.3	19
\mathcal{A}^i	Faktor, um den das Licht auf dem Weg zur i -ten Grenzfläche abgeschwächt wird	4.1.2	81
$A_k(t)$	monochromatische Amplitude für die Wellenzahl k , allgemein oder speziell im Detektionsarm	A.1.1	117
a_l	Amplitude der l -ten Oberfrequenzkomponente von $\zeta_{\text{mod}}(\varphi)$	4.2.5	97
A_{mod}	Amplitude der optischen Weglänge, um die das Element ausgelenkt wird, welches die Phasenmodulation im Referenzarm erzeugt	2.2.3	27
a_ν	Amplitude der Lichtwellenleitermode $\nu \in \mathbb{N}$	2.1.2	18
$A_{rk}(z, t)$	monochromatische Amplitude für die Wellenzahl k aufgrund von Licht im Detektionsarm, welches im Referenzarm reflektiert wurde	4.1.5	85
$A_{sk}(z, t)$	monochromatische Amplitude für die Wellenzahl k aufgrund von Licht im Detektionsarm, welches im Probenarm reflektiert wurde	4.1.5	86
a_x	Pixelgröße in der schnellen Rasterrichtung	4.1.1	80
a_y	Pixelgröße in der langsamen Rasterrichtung	4.1.1	80
\mathcal{B}	Menge der Punkte des Bildfelds	4.1.1	80
β_ν	Ausbreitungskonstante der Lichtwellenleitermode $\nu \in \mathbb{N}$	2.1.2	18
C_{crystal}	Kapazität des elektrooptischen Kristalls	B.2.3	141
C_{mod}	Summe aus Kristallkapazität und parasitären Kapazitäten, die während des Betriebs des elektrooptischen Phasenmodulators umgeladen werden muß	B.2.4	142
d	Kantenlänge des Querschnitts des elektrooptischen Kristalls	B.2.2	140
Δf	Defokussierung (Abbildung 2.4)	2.1.3	20
Δk	Halbwertsbreite einer GAUSSförmigen spektralen Leistungsdichte als Funktion der Wellenzahl	2.2.1	23

Δk^q	Halbwertsbreite der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle als Funktion der Wellenzahl	4.1.3	82
$\Delta \lambda$	Halbwertsbreite einer GAUSSförmigen spektralen Leistungsdichte als Funktion der Wellenlänge	2.2.1	24
$\Delta \lambda^q$	Halbwertsbreite der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle als Funktion der Wellenlänge	4.1.3	82
Δn	durch den elektrooptischen Effekt im Kristall induzierte Brechungsindexänderung	B.2.3	141
Δt	Zeitauflösung der Simulation	4.1.1	80
Δz	optische Weglängendifferenz zwischen Proben- und Referenzarmlänge (Abbildung 2.5)	2.2.1	23
$\Delta z^i(t)$	optische Weglängendifferenz zwischen der Referenzarmlänge und dem Abstand der i -ten Grenzfläche des Gewebemodells vom Strahlteiler	4.1.5	87
Δz_r	Differenz zweier z_r -Koordinatenwerte	3.1.6	48
Δz_s	Differenz zweier z_s -Koordinatenwerte	3.1.6	48
d_{i01}	eingestellte Bildweite des optischen Systems zur Beleuchtung beim konfokalen Mikroskop (Abbildung 2.3)	2.1.2	16
d_{i12}	eingestellte Bildweite des optischen Systems zur Detektion beim konfokalen Mikroskop (Abbildung 2.3)	2.1.2	16
d_{o01}	eingestellte Gegenstandsweite des optischen Systems zur Beleuchtung beim konfokalen Mikroskop (Abbildung 2.3)	2.1.2	16
d_{o12}	eingestellte Gegenstandsweite des optischen Systems zur Detektion beim konfokalen Mikroskop (Abbildung 2.3)	2.1.2	16
E	Betrag der elektrischen Feldstärke innerhalb des elektrooptischen Kristalls	B.2.3	141
\mathbf{E}	Vektor der elektrischen Feldstärke innerhalb des elektrooptischen Kristalls	B.2.1	139
η	Hilfsvariable für Gleichung (3.2)	3.1.6	51
ε_0	Dielektrizitätskonstante des Vakuums, elektrische Permittivität des Vakuums	B.2.3	141
ε_r	Dielektrizitätszahl, relative elektrische Permittivität	B.2.3	141
F	F -Parameter	3.1.6	51

f_c	äquivalent zu d_{o01} und d_{i12} für $d_{o01} = d_{i12}$, Brennweite des Kollimators eines konfokalen Mikroskops, optimaler Abstand zwischen Lichtwellenleiterende und Kollimator (Abbildung 3.7)	2.1.2	16
$f_\nu(x, y)$	Profil der Lichtwellenleitermode $\nu \in \mathbb{N}$	2.1.2	18
f_o	äquivalent zu d_{i01} und d_{o12} für $d_{i01} = d_{o12}$, Brennweite des Objektivs eines konfokalen Mikroskops	2.1.2	16
g	Anisotropieparameter	1.1.2	5
Γ	durch den elektrooptischen Effekt im Kristall induzierte Änderung der optischen Weglänge für einfache Passage	B.2.3	141
Γ_{pol}	Polarisationsgrad	B.1.3	130
$\gamma_{\text{rs}}(\Delta z)$	komplexer Kohärenzgrad	2.2.1	24
h_{01}	Punktbildfunktion des optischen Systems zur Beleuchtung	2.1.2	16
h_{12}	Punktbildfunktion des optischen Systems zur Detektion	2.1.2	16
\mathcal{H}_1^+	Wert proportional zu einem beliebigen überhöhten Maximum der ersten Harmonischen	4.2.6	100
\mathcal{H}_1^-	Wert proportional zu einem beliebigen abgesenkten Maximum der ersten Harmonischen	4.2.6	100
\mathcal{H}_{1X}	X -Komponente der ersten Harmonischen	3.1.3	39
\mathcal{H}_{1Y}	Y -Komponente der ersten Harmonischen	3.1.3	39
\mathcal{H}_2^+	Wert proportional zu einem beliebigen überhöhten Maximum der zweiten Harmonischen	4.2.6	100
\mathcal{H}_2^-	Wert proportional zu einem beliebigen abgesenkten Maximum der zweiten Harmonischen	4.2.6	100
\mathcal{H}_{2X}	X -Komponente der zweiten Harmonischen	3.1.3	39
\mathcal{H}_{2Y}	Y -Komponente der zweiten Harmonischen	3.1.3	39
h_c	Punktbildfunktion des konfokalen Mikroskops, Gleichung (2.14)	2.1	13
h_f	Punktbildfunktion des konfokalen Mikroskops bei Verwendung eines Monomodenlichtwellenleiters	2.1.2	19
\mathcal{H}_m	m -te Harmonische, also die im zeitabhängigen Detektorsignal bei der Frequenz $m\omega_{\text{mod}}/2\pi$ übertragene Leistung	2.2.3	29

h	Punktbildfunktion, allgemein oder speziell für das optische System bestehend aus Objektiv und Kollimator beim konfokalen Mikroskop	2.1.2	16
\hat{h}	Punktbildfunktion des optischen Systems bestehend aus Objektiv und Kollimator beim konfokalen Mikroskop unter Einbeziehung der Vergrößerung	2.1.2	19
h_{OCM}	axiale Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops	3.2.1	55
h_{r}	Punktbildfunktion des optischen Systems im Referenzarm in Richtung des Elements zur Phasenverzögerung	2.2.1	21
h_{s}	Punktbildfunktion des konfokalen Mikroskops im Probenarm	2.2.1	21
I	Intensität, allgemein	1.1.2	5
$I(t)$	zeitabhängige Intensität des Detektorsignals bei der Simulation, speziell	4.1.5	87
i	Index einer Grenzfläche im Gewebemodell	4.1.2	81
I_0	Skalierungsfaktor der Intensität des Detektorsignals	4.1.5	87
I_{bias}	konstanter Untergrund im Detektorsignal aufgrund von statischen Störreflexionen im Interferometer	4.1.5	87
$I_k(t)$	monochromatische Intensität im Detektionsarm für die Wellenzahl k	2.2.1	23
I_{mod}	Amplitude des Wechselstroms, der die Kristallelektroden bei der elektrooptischen Phasenmodulation lädt und entlädt	B.2.4	142
$I_{\text{noise}}(t)$	weißes Rauschen im Detektorsignal	4.1.5	87
$I_{\text{noise}0}$	Effektivwert des weißen Rauschens I_{noise}	4.1.5	87
I_{OCM}	Bildintensität bei der optischen Kohärenzmikroskopie	2.2.3	29
$I_{\text{r}}(t)$	Term der polychromatischen Intensität im Detektionsarm, in welchen nur die Reflexion aus dem Referenzarm einfließt	4.1.5	87
I_{ref}	Bildintensität bei der Reflexionsmikroskopie, also bei blockiertem Referenzarm	3.1.1	34
$I_{\text{rk}}(t)$	Term der monochromatischen Intensität im Detektionsarm für die Wellenzahl k , in welchen nur die Reflexion aus dem Referenzarm einfließt	4.1.5	86

$I_{\text{rmod}}(\varphi)$	Intensitätsschwankung aufgrund der sich abhängig von der Phase φ der Phasenmodulation ändernden Einkopplungseffizienz $\zeta_{\text{mod}}(\varphi)$ im Referenzarm	4.2.3	90
$I_{\text{rmod}0}$	Amplitude eines harmonischen Wechselsignalanteils $I_{\text{rmod}}(\varphi)$	4.2.3	90
$I_{\text{rs}}^i(t)$	Term der polychromatischen Intensität im Detektionsarm, in welchen das Produkt aus dem Reflexionsvermögen im Referenzarm und der effektiven Reflexionsstärke der i -ten Grenzfläche des Gewebemodells einfließt	4.1.5	87
$I_{\text{rs}k}^i(t)$	Term der monochromatischen Intensität im Detektionsarm für die Wellenzahl k , in welchen das Produkt aus dem Reflexionsvermögen im Referenzarm und der effektiven Reflexionsstärke der i -ten Grenzfläche des Gewebemodells einfließt	4.1.5	86
$I_{\text{s}}^i(t)$	Term der polychromatischen Intensität im Detektionsarm, in welchen nur die Reflexion an der i -ten Grenzfläche des Gewebemodells einfließt	4.1.5	87
$I_{\text{s}}^{ij}(t)$	Term der polychromatischen Intensität im Detektionsarm, in welchen das Produkt aus den effektiven Reflexionsstärken der i -ten und der j -ten Grenzfläche des Gewebemodells einfließt	4.1.5	87
$I_{\text{s}k}^i(t)$	Term der monochromatischen Intensität im Detektionsarm für die Wellenzahl k , in welchen nur die Reflexion an der i -ten Grenzfläche des Gewebemodells einfließt	4.1.5	86
$I_{\text{s}k}^{ij}(t)$	Term der monochromatischen Intensität im Detektionsarm für die Wellenzahl k , in welchen das Produkt aus den effektiven Reflexionsstärken der i -ten und der j -ten Grenzfläche des Gewebemodells einfließt	4.1.5	86
k	Wellenzahl	2.1.2	16
k_0	Zentralwellenzahl einer GAUSSförmigen spektralen Leistungsdichte	2.2.1	23
k_0^q	Zentralwellenzahl der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.1.3	82
k_{eff}	effektive Wellenzahl, spektral gewichteter Mittelwert des Spektrums der Lichtquelle	4.1.3	82
K_{r}	Konstante gemäß Gleichung (4.37), benötigt bei der Interpretation des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts	4.2.5	96

K_{rs}^{iq}	zeitabhängige Größe gemäß Gleichung (4.38), benötigt bei der Interpretation des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts	4.2.5	96
K_{speckle}	Ortsfrequenzintervall, in dem Speckles erwartet werden	3.2.7	68
$K_{\text{structure}}$	Ortsfrequenzintervall, in dem niederfrequente Strukturmerkmale erwartet werden	3.2.7	68
L	Länge des elektrooptischen Kristalls	B.2.2	140
l	Index der Oberfrequenzkomponente von $\zeta_{\text{mod}}(\varphi)$ für die Oberfrequenz $l\omega_{\text{mod}}/2\pi$	4.2.5	97
λ	Wellenlänge	1.1.2	6
λ_0	Zentralwellenlänge einer GAUSSförmigen spektralen Leistungsdichte	2.2.1	22
λ_0^q	Zentralwellenlänge der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.1.3	82
λ_{eff}	effektive Wellenlänge, spektral gewichteter Mittelwert des Spektrums der Lichtquelle	4.1.3	82
l_c	Kohärenzlänge	2.2.1	24
L_{in}	eingangsseitige Induktivität des Übertragers zur Ansteuerung des elektrooptischen Kristalls	B.2.4	143
L_{mod}	ausgangsseitige Induktivität des Übertragers zur Ansteuerung des elektrooptischen Kristalls	B.2.4	143
l_r	optische Weglänge zwischen dem Strahlteiler und dem Ursprung des z_r -Koordinatensystems (Abbildung 2.5)	2.2.1	22
l_s	optische Weglänge zwischen dem Strahlteiler und der objektseitigen Objektivbildebene des Mikroskopobjektivs (Abbildung 2.5)	2.2.1	22
M	Vergrößerung des optischen Systems bestehend aus Objektiv und Kollimator beim konfokalen Mikroskop	2.1.2	16
M_{01}	Vergrößerung des optischen Systems zur Beleuchtung	2.1.2	16
M_{12}	Vergrößerung des optischen Systems zur Detektion	2.1.2	16
μ_a	Absorptionskoeffizient	1.1.2	5
μ_{eff}	effektiver Extinktionskoeffizient, Kehrwert der effektiven Eindringtiefe	1.1.2	5
μ_s	Streukoeffizient	1.1.2	5

μ_t	Gesamtstrahlungsverlustrate, totale Strahlungsverlustrate, Kehrwert der mittleren freien Weglänge eines Photons	1.1.2	5
m_x	Index eines Bildpunkts in der schnellen Rasterrichtung	4.1.1	80
m_y	Index eines Bildpunkts in der langsamen Rasterrichtung	4.1.1	80
n	Brechungsindex	1.1.2	5
n_1	Brechungsindex des Mediums, von dem aus ein Lichtstrahl bei Brechung kommt	1.1.2	6
n_2	Brechungsindex des Mediums, in das ein Lichtstrahl bei Brechung übergeht	1.1.2	6
N.A.	numerische Apertur	2.1.3	21
N.A. _{eff}	effektive numerische Apertur	3.1.4	44
N_{cycles}	Anzahl von Modulationsperioden, die zur Berechnung der abgetasteten Beträge der Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 herangezogen werden	4.1.1	80
n_e	Brechungsindex eines Kristalls für die außerordentliche Polarisationsrichtung	B.2.1	140
N_{extr}	Zahl der Extremstellen des Detektorsignals in einem Zyklus der Phasenmodulation	3.1.6	51
$n_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda)$	Brechungsindex von Wasser	1.1.2	7
ν_{mod}	Frequenz der Phasenmodulation im Referenzarm	3.1.1	34
n_o	Brechungsindex eines Kristalls für die ordentliche Polarisationsrichtung	B.2.1	139
N_R	Anzahl der Grenzflächen des Gewebemodells	4.1.2	81
ν_r	Ortsfrequenzkoordinate im azimuthal gemittelten Leistungsspektrum	3.2.7	69
N_{src}	Anzahl der GAUSSförmigen Komponenten der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.1.3	82
N_x	Anzahl der Bildpunkte in der schnellen Rasterrichtung abzüglich 1	4.1.1	80
n_x	Brechungsindex eines Kristalls entlang seiner x -Achse	B.2.1	139
N_y	Anzahl der Bildpunkte in der langsamen Rasterrichtung	4.1.1	80
n_y	Brechungsindex eines Kristalls entlang seiner y -Achse	B.2.1	139
n_z	Brechungsindex eines Kristalls entlang seiner z -Achse	B.2.1	139

$\mathcal{O}(x_1, y_1)$	komplexe Amplitudentransmission des Objekts	2.1.2	16
ω_{mod}	Kreisfrequenz der Phasenmodulation im Referenzarm	2.2.3	27
$p(\Delta z)$	Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle	2.2.1	24
$\mathcal{P}(x_2, y_2)$	komplexe Amplitudentransmission der Lochblende	2.1.2	16
P_0	Ausgangslichtleistung der Lichtquelle	B.1.1	129
P_{1r}	Lichtleistung am Ausgang des Referenzarms	B.1.1	129
P_{1s}	Lichtleistung am Ausgang des Probenarms	B.1.1	129
P_{2r}	Lichtleistung am Ausgang des Detektionsarms, wenn der Probenarm blockiert ist	B.1.1	129
P_{2s}	Lichtleistung am Ausgang des Detektionsarms wenn der Referenzarm blockiert ist	B.1.1	129
P_{bias}	Untergrundlichtleistung am Ausgang des Detektionsarms, wenn Proben- und Referenzarm blockiert sind	B.1.1	129
φ_{mod}	Phasenlage des Arbeitspunkts der Phasenmodulation im Referenzarm	2.2.3	27
$\hat{\varphi}_{\text{mod}}$	Hilfsvariable für Gleichung (3.2)	3.1.6	51
$\varphi_{\text{mod}}^{iq}$	Phasenlage des Arbeitspunkts der Phasenmodulation im Referenzarm für die i -te Grenzfläche des Gewebemodells und die q -te Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.2.5	97
φ_{pol}	Winkel der Polarisationsrichtung gemäß Gleichung (B.2)	B.1.3	131
φ_{ζ}	Phasenlage eines harmonischen Wechselsignalanteils $I_{r\text{mod}}(\varphi)$ relativ zur Phasenmodulation	4.2.3	90
φ_{ζ}^l	Phasenlage der l -ten Oberfrequenzkomponente von $\zeta_{\text{mod}}(\varphi)$ relativ zur Phasenmodulation	4.2.5	97
P_{mod}	Leistung, die aufgrund des Widerstandes R_{mod} beim Umladen der Kristallelektroden verbraucht wird	B.2.4	142
$P_r(\nu_r)$	azimutal gemittelt Leistungsspektrum	3.2.7	69
P_{speckle}	im Ortsfrequenzintervall K_{speckle} übertragene Leistung	3.2.7	69
P_{src}	optische Ausgangsleistung der Lichtquelle	2.2.1	23
$P_{\text{structure}}$	im Ortsfrequenzintervall $K_{\text{structure}}$ übertragene Leistung	3.2.7	69
q	Index einer GAUSSförmigen Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.1.3	82

\mathcal{Q}_m	diskrete Menge aller Modulationsamplituden A_{mod} , für die $\mathcal{H}_m^2 + \mathcal{H}_{m+1}^2$ unabhängig von der Phase φ_{mod} ist	2.2.3	29
r	elektrooptischer Tensor	B.2.1	139
R_{axial}	axiales Auflösungsvermögen als Halbwertsbreite der axialen konfokalen Punktbildfunktion	2.1.3	21
R_{F}	Reflexionskoeffizient der Gewebeoberfläche, entspricht R_{s}^1	1.1.2	5
r_{ij}	Element des elektrooptischen Tensors r	B.2.1	139
R_{in}	Innenwiderstand der für den Betrieb des elektrooptischen Phasenmodulators verwendeten Spannungsquelle	B.2.4	142
R_{mod}	ohmscher Widerstand des die beiden Elektroden des elektrooptischen Kristalls verbindenden Leiters	B.2.4	142
R_{s}	axiale Verteilung des Reflexionsvermögens im Probenarm	4.1.2	81
\mathcal{R}_{s}	effektive Reflexionsstärke (Abschnitt 4.1.2)	2.2.1	22
R_{s}^i	Reflexionsvermögen der i -ten Grenzfläche (Abschnitt 4.1.2)	2.2.1	23
\mathcal{R}_{s}^i	effektive Reflexionsstärke der i -ten Grenzfläche	4.1.2	81
R_{r}	Reflexionsvermögen des Spiegels im Referenzarm	2.2.1	23
\mathcal{S}	Menge der abgetasteten Bildpunkte	4.1.1	80
S^q	Maximalwert der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.1.3	82
S_{src}	spektrale Leistungsdichte der Lichtquelle	2.2.1	23
t	Zeit	4.1.1	80
τ	Zeitkonstante der Demodulationselektronik	4.1.1	80
t_{crystal}	Zeit, die eine Welle zum Durchlaufen des elektrooptischen Kristalls benötigt	B.2.6	144
θ	Hilfsvariable für Gleichung (3.2)	3.1.6	51
T_{lim}	Dauer, über die der Detektor Intensitäten mittelt	A.1.1	118
T_{mod}	Dauer eines Modulationszyklus, ν_{mod}^{-1}	B.2.6	145
$U(x, y, z)$	dreidimensionale Verteilung der komplexen Amplitude	2.1.2	16
U_{crystal}	Amplitude der am elektrooptischen Kristall anliegenden Wechselspannung	B.2.2	140

U_{mod}	Spannungsamplitude des harmonischen Signals, welches die Phasenmodulation im Referenzarm antreibt und steuert	3.1.5	47
U_x	Spannung des Steuersignals für die Rasterung entlang der schnellen Rasterrichtung	3.1.4	39
U_y	Spannung des Steuersignals für die Rasterung entlang der langsamen Rasterrichtung	3.1.4	39
v_x	Geschwindigkeit der schnellen Rasterbewegung	4.1.1	80
W	logarithmisches Verhältnis der in den Ortsfrequenzintervallen K_{speckle} und $K_{\text{structure}}$ übertragenen Leistungen	3.2.7	69
w^q	normierter Gewichtungsfaktor der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle	4.1.3	82
x	laterale Koordinate, senkrecht zur optischen Achse, wird verwendet als kartesische Raumkoordinate oder zur Beschreibung einer lateralen Rasterverschiebung	2.1.1	15
x_0	laterale Koordinate des Bildfeldzentrums relativ zur Probe entlang der schnellen Rasterrichtung	3.1.1	34
ξ	Strahlteilerverhältnis	4.1.5	83
y	laterale Koordinate, senkrecht zur optischen Achse, wird verwendet als kartesische Raumkoordinate oder zur Beschreibung einer lateralen Rasterverschiebung	2.1.1	15
y_0	laterale Koordinate des Bildfeldzentrums relativ zur Probe entlang der langsamen Rasterrichtung	3.1.1	34
z	axiale Koordinate entlang der optischen Achse, wird verwendet als kartesische Raumkoordinate oder zur Beschreibung einer axialen Rasterverschiebung	1.1.2	5
$\zeta_{\text{mod}}(\varphi)$	Faktor, um den sich die Einkopplungseffizienz im Referenzarm abhängig von der Phase φ der Phasenmodulation ändert	4.1.5	85
$\zeta_{\text{mod}0}^2$	Verhältnis aus Wechsel- und Gleichspannungsanteil der aus dem Referenzarm kommenden Lichtintensität bei Vorliegen einer sich harmonisch ändernden Einkopplungseffizienz, Definition stimmt nicht mit der von a_1 aus Gleichung (4.40) überein (Abschnitt 4.2.6)	4.2.3	90
ζ_r	Einkopplungseffizienz des Kollimators im Referenzarm	3.1.5	46
ζ_s	Einkopplungseffizienz des konfokalen Mikroskops im Probenarm	3.1.4	44

z_T	axiale Koordinate des Referenzarmspiegels (Abbildung 2.5)	2.2.1	21
z_S	axialer Abstand von der Bildebene des Mikroskopobjektivs (Abbildung 2.5)	2.2.1	23
z_S^i	axialer Abstand der i -ten Grenzfläche (Abschnitt 4.1.2) von der Bildebene des Mikroskopobjektivs	2.2.1	23

Kurzfassung

In Industrienationen sind bösartige Neubildungen von Gewebe (Krebs) eine der bedeutendsten Todesursachen. Bei rechtzeitiger Therapie ergeben sich deutlich günstigere Überlebensraten, jedoch sind frühe Neubildungen und deren Vorformen generell schwieriger zu erkennen und korrekt zu diagnostizieren. Wesentlicher Bestandteil der Diagnose ist die Klassifikation der Neubildung bezüglich des Differenzierungsgrades der Zellen, der bislang nur über die Entnahme einer Biopsie und deren anschließender histologischer Aufbereitung *in vitro* bestimmbar ist. Dazu wird die Gewebeprobe im pathologischen Labor fixiert, in Scheiben der Dicke einer Zellschicht geschnitten, gefärbt, mikroskopiert und primär anhand der Morphologie des Zellverbandes beurteilt. Epitheliale Neubildungen (Karzinome) der Oberflächen von Haut und Hohlorganen wären einer Histologie *in vivo* zugänglich, jedoch können konventionelle Mikroskope einzelne Zellschichten aufgrund der starken Steuung in Gewebevolumina nicht darstellen. Ein Instrument für die *in vivo*-Histologie wäre wünschenswert und sollte klein genug für den endoskopischen Einsatz sein, um beispielsweise auch in dem im Rahmen der Früherkennung so bedeutsamen Verdauungstrakt anwendbar zu sein.

Konfokale Mikroskopie und optische Kohärenztomographie sind tomographische Verfahren, bei denen der Anteil gestreuten Lichts an der Bildintensität deutlich reduziert ist und die unter Verwendung von Lichtwellenleitern miniaturisierbar sind. In biologischem Gewebe erzielt die konfokale Mikroskopie Informationstiefen bis zu $50\ \mu\text{m}$ und eine hohe laterale Auflösung, während die optische Kohärenztomographie aufgrund des interferometrischen Kohärenzfilters eine hohe Dynamik mit Informationstiefen von 1 mm erreicht, ohne aber eine mikroskopische laterale Auflösung aufzuweisen. Die optische Kohärenzmikroskopie vereint die Vorteile beider Verfahren, indem sie Konfokalität und Kohärenzfilter kombiniert. Die Bildaufnahme erfolgt lateral bei fester axialer Lage des Kohärenzfilters, weshalb zum Messen der Bildinformation darstellenden Kohärenzgrades eine Phasenmodulation im Referenzarm des Interferometers eingeführt wird. Diese Arbeit entwickelt in drei Teilen die optische Kohärenzmikroskopie in Richtung eines Systems für die endoskopische *in vivo*-Histologie.

Im ersten Teil wird ein optisches Kohärenzmikroskop im Labormaßstab aufgebaut und die Eignung der Bildgebung für die Anwendung auf Epithelien des Verdauungstrakts untersucht. Es arbeitet bei der Zentralwellenlänge $\lambda_0 = 1310\ \text{nm}$ und besitzt eine Kohärenzlänge von $14,4\ \mu\text{m}$. Seine laterale Auflösung liegt bei $1,45\ \mu\text{m}$, die axiale Auflösung bei $3,0\ \mu\text{m}$. Bildraasterung und Phasenmodulation im Referenzarm erfolgen piezoelektrisch. Das phasenmodulierte Interferenzsignal wird von zwei Lock-In-

Verstärkern demoduliert. Bei Blockieren des Referenzarms wird der Aufbau zu einem konventionellen konfokalen Reflexionsmikroskop, was generell für Vergleiche zwischen optischer Kohärenz- und konfokaler Reflexionsmikroskopie herangezogen wird. So erreicht das optische Kohärenzmikroskop eine um 28 dB bessere Dynamik und ist Aberrationen gegenüber weniger empfindlich. Robuste und für den klinischen Einsatz relevante Algorithmen zur automatisierten Inbetriebnahme eines optischen Kohärenzmikroskops werden entwickelt, insbesondere zur Fokussierung auf die Gewebeoberfläche, zum Abgleich der Längen von Proben- und Referenzarm und zum Einstellen der Amplitude der Phasenmodulation. Die Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops wird als Funktion der Referenzarmlänge vermessen und unter Bezug auf die Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle interpretiert. Sie wird unter anderem herangezogen, um Möglichkeiten der Reduktion von Speckles vorzuschlagen. Das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt wird erstmals beschrieben. Zur Erfassung der Topologie von Oberflächen wird eine sehr einfache Methode zur Ableitung von hochaufgelösten Isophasenlinien im Abstand $\lambda_0/8$ vorgestellt. Bei allen Epithelien des Verdauungstrakts können Zellmembranen identifiziert werden. Platten- und Zylinderepithel können anhand der azimuthal gemittelten Leistungsspektren von oberflächennahen Bildern automatisiert voneinander unterschieden werden.

Im zweiten Teil werden die mathematischen Grundlagen zur rechnerbasierten Simulation der Bildgebung eines optischen Kohärenzmikroskops erarbeitet. Simuliert wird für jede Bildzeile das Signal der zeitabhängigen, detektierten Intensität sowie die Demodulation dieses Signals. Das Gewebemodell besteht aus beliebig vielen reflektierenden Grenzflächen. Die spektrale Leistungsdichte der Lichtquelle ist als Summe beliebig vieler GAUSSförmiger Verteilungen modellierbar. Die Simulation wird erfolgreich angewendet, um die Ursache des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts nachzuweisen. Neben dem Vergleich mit dem Experiment wird das Ergebnis theoretisch untermauert, was eine verfeinerte Unterscheidung zwischen verfahrensinhärenten und justagebedingten Ursachen des Artefakts erlaubt. Eine Strategie zur Minimierung des kritischen justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts wird aufgezeigt.

Im dritten Teil wird basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen ein implementierbares Konzept für ein endoskopisches optisches Kohärenzmikroskop erarbeitet. Eine geeignete konfokale Sonde wird erstmals vorgestellt. Sie erreicht mittels eines kardanisch gelagerten, miniaturisierten Rasterspiegels eine Bildrate von 0,5 Hz. Zur elektrooptische Phasenmodulation mittels eines Lithiumniobatkristalls bei der Frequenz 10 MHz wird eine Impedanzwandlungsschaltung entworfen, um einen leistungsschwachen Oszillator als Treiber einsetzen zu können. Zur Demodulation des hochfrequent phasenmodulierten Interferenzsignals wird eine kostengünstige analoge Schaltung aufgebaut. Neben weiteren Anpassungen an die im Vergleich zum Laboraufbau höhere Bandbreite der Bildaufnahme werden Randbedingungen für den klinischen Einsatz berücksichtigt.

Zusammenfassend wurde die bisher nur im Labor realisierte optische Kohärenzmikroskopie so analysiert und weiterentwickelt, daß im Anschluß mit einem Industriepartner mit der Implementierung eines innovativen, produktnahen Prototyps begonnen werden konnte, durch den sich das im Hinblick auf die endoluminale Mikroskopie hier nachgewiesene Potential der optischen Kohärenzmikroskopie entfalten können wird.

Abstract

Malignant neoplasia (cancer) are among the most significant causes of death in industrialized countries. Early therapy leads to clearly better survival rates, however, early stage neoplasia and their prestages are generally harder to detect and diagnose correctly. Essential for diagnosis is the classification of the neoplasm with regard to its cellular differentiation (grading), which up to now can only be determined by taking a biopsy which then has to be processed *in vitro* in a pathological laboratory. In detail, the sample is fixed, cut into slices as thick as a cellular layer, stained, observed microscopically and assessed primarily with regard to the morphology of the cellular arrangement. Epithelial neoplasia (carcinoma) of the surfaces of skin or hollow organs would be accessible to histology *in vivo*, but conventional microscopes cannot image single cellular layers because of the strong scattering within tissue volumes. A device for *in vivo*-histology would be desirable. It should be small enough for endoscopic use, for example in the gastrointestinal tract, which is important to early recognition programmes.

Confocal microscopy and optical coherence tomography are tomographic methods, which effectively filter scattered light that otherwise would contribute to image intensity. They can be miniaturized using optical fibers. In biological tissue, confocal microscopy yields information depths of up to $50\ \mu\text{m}$ and a high lateral resolution. In contrast, optical coherence tomography offers high dynamics with information depths of 1 mm by using an interferometric coherence gate, but does not provide microscopic lateral resolution. Optical coherence microscopy merges the advantages of both methods by combining confocality with coherence-gated imaging. Images are acquired in lateral direction at a fixed axial position of the coherence gate. Therefore, a phase modulation has to be employed in the interferometer's reference arm to measure the degree of coherence and thus the image intensity. This three-part work develops optical coherence microscopy towards a system for endoscopic *in vivo*-histology.

In the first part an optical coherence microscope is set up on a laboratory scale to investigate to which degree confocal low-coherence reflectometry can be applied to image epithelial layers of the gastrointestinal tract. A central wavelength of $\lambda_0 = 1310\ \text{nm}$ is used, and the coherence length is $14,4\ \mu\text{m}$. Lateral and axial resolutions are $1,45\ \mu\text{m}$ and $3,0\ \mu\text{m}$, respectively. Scanning of the sample as well as the phase modulation in the reference arm are performed piezoelectrically. The phase-modulated interference signal is demodulated using two lock-in amplifiers. The setup can be converted to a conventional confocal reflection microscope by blocking the reference arm. This is

generally employed to compare optical coherence and confocal reflection microscopy. For example, the optical coherence microscope provides a 28 dB improvement in dynamics, and it is less sensitive to aberrations. Robust and clinically relevant algorithms for the automated initialization of an optical coherence microscope are developed. They include algorithms for focussing onto the tissue surface, adjusting the lengths of the sample and reference arms and setting the amplitude of the phase modulation. The point spread function of the optical coherence microscope is measured as a function of the reference arm length and interpreted regarding the autocorrelation function of the light source. It is, among other techniques, used to propose ways to reduce speckles. The fringe-like artifact related to the object phase is described for the first time. A very simple method to determine surface topologies is introduced, with which highly resolved isophase lines separated by $\lambda_0/8$ can be derived. Cellular membranes can be identified for all epithelial layers of the gastrointestinal tract. Columnar and squamous epithelium can be automatically distinguished based on azimuthally averaged power spectra of images recorded close to the surface.

In the second part mathematical foundations for the computer-based simulation of the imaging of an optical coherence microscope are worked out. For each line of an image the signal of the time-dependent detected intensity is simulated as well as the demodulation of this signal. The tissue model comprises an arbitrary number of reflecting boundary faces. The spectral power density of the light source can be modelled as a sum of an arbitrary number of GAUSSIAN distributions. The simulation is applied successfully to provide evidence for the cause of the fringe-like, object phase-related artifact. Besides being compared to an experiment, the result is substantiated theoretically, which leads to a refined discrimination between two causes of the artifact, one of which is inherent to the imaging method itself while the other is due to alignment issues. A strategy to minimize the critical fringe-like, object phase-related artifact caused by misalignment is shown.

In the third part a realizable concept for an endoscopic optical coherence microscope is developed based on the results yielded before. A suitable confocal probe is presented for the first time. Using a gimbal-mounted miniaturized mirror for scanning, it achieves an image rate of 0,5 Hz. For an electrooptic phase modulation with a lithium niobate crystal at 10 MHz frequency an impedance-converting circuit is designed to enable the use of a low-power oscillator to drive the modulation. For the high-frequency demodulation of the interference signal an economical analog circuit is set up. The concept includes additional adaptations to the increased bandwidth of image acquisition, which is significantly higher compared to the laboratory setup. In addition, boundary conditions for a clinical application are taken into account.

Until now optical coherence microscopy has only been realized in a laboratory environment. Based on the analytical results and technological advances of this work, the implementation of an innovative prototype has been initiated together with a medical device company. The promising potential of optical coherence microscopy for endoluminal microscopy presented here will be unfolded with this prototype.

Kapitel 1

Einleitung

The human body can be described as a machine controlled by the world's most sophisticated microcomputer, about the size of a grapefruit and largely self-programmable. [...] To a large extent, the machine is self-repairing. However, in the event of a malfunction, diagnosis of the problem (and its correction) should be achieved ideally without lifting the bonnet and with minimal damage to external bodywork or internal components.

(Boddy und Morucci 2001)

Während sich die optische Kohärenztomographie im vergangenen Jahrzehnt zu einem endoluminal einsetzbaren Verfahren entwickelt hat und für ophthalmologische Anwendungen bereits Geräte angeboten werden, steht die Kohärenzmikroskopie noch eher abseits des Forschungsinteresses, nicht zuletzt weil aufgrund ihrer technisch anspruchsvolleren Demodulations- und Sondenkonzepte eine kommerzielle Nutzung augenblicklich wenig attraktiv scheint.

Dennoch muß davon ausgegangen werden, daß ein Verständnis der Bildgebung der optischen Kohärenzmikroskopie und der damit verbundenen technologischen Hürden der Schlüssel für eine Einführung der optischen Kohärenztomographie mit hoher lateraler Auflösung sein wird. Am Ende könnte sich somit ein System etablieren, das die einfache Demodulation der optischen Kohärenztomographie mit den Sondenkonzepten der optischen Kohärenzmikroskopie kombiniert. Abgesehen von Entwicklungen in Fortführung der hier präsentierten Ergebnisse gibt es aber derzeit weltweit keine Versuche, die optische Kohärenzmikroskopie in eine endoluminal anwendbare Form zu bringen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bildgebung mit einem optischen Kohärenzmikroskop in Hinblick auf eine Anwendung im Verdauungstrakt. Erstmals wird ein Konzept für den endoluminalen Einsatz der optischen Kohärenzmikroskopie erarbeitet. Ein konfokales Rastermikroskop wird vorgestellt, bei dem die Rasterung auf einem elektrostatisch angetriebenen und kardanischen gelagerten Mikrospeigel beruht.

Kapitel 1 und 2 definieren den Begriff der endoluminalen Mikroskopie, erläutern das

Funktionsprinzip des konfokalen Mikroskops und stellen die optische Kohärenzmikroskopie im Vergleich zur optischen Kohärenztomographie vor. Sie fassen damit die physikalischen Grundlagen einer endoluminalen optischen Kohärenzmikroskopie zusammen, wobei besonders Abschnitt 2.2.3 mit den Abbildungen 2.7 bis 2.9 didaktisch über bisherige Darstellungen (Hoeling u. a. 2000) der Demodulationstechnik hinausgeht. Der medizinische Hintergrund wird nur umrissen. Anhang C geht dafür umfassender auf die Anatomie der Hohlorganwände, Neubildungen von Gewebe und die endoluminale Diagnostik ein.

In Kapitel 3 wird das in Form eines Laboraufbaus entwickelte optische Kohärenzmikroskop beschrieben. Seine Komponenten werden charakterisiert. Algorithmen für ein effizientes Mikroskopieren werden vorgestellt, und die Bildgebung, einschließlich beobachteter Artefakte, wird anhand technischer und biologischer Proben untersucht.

Ein beobachtetes Artefakt sind Intensitätsschwankungen, die mit der Objektphase korreliert sind. Diese führen beispielsweise bei planaren Objekten zu Streifen. Die Ursache hierfür war nicht klar ersichtlich, konnte aber mit Hilfe einer rechnergestützten Simulation als teilweise verfahrensinhärent, primär aber justagebedingt identifiziert werden. Diese Simulation der Bildentstehung im optischen Kohärenzmikroskop wird in Kapitel 4 erarbeitet und auf das Problem angewendet.

Als Blick in die Zukunft geht Kapitel 5 unter Bezug auf die Ergebnisse der Kapitel 3 und 4 auf die bereits teilweise realisierte Konzeption eines endoluminal einsetzbaren optischen Kohärenzmikroskops ein. Dazu soll ein miniaturisiertes Laser-Rastermikroskop in den Aufbau integriert werden, welches eine Bildrate von mindestens 0,5 Hz erreicht. Als Folge müssen die Komponenten für Modulation, Detektion und Demodulation der im Vergleich zum Laboraufbau deutlich höheren Pixelrate angepaßt werden.

Angesichts des an einigen Stellen umfangreichen Gebrauchs von Symbolen, besonders für mathematische und physikalische Größen, wird der Leser auf das Symbolverzeichnis im Verzeichnisteil am Anfang hingewiesen.

1.1 Endoluminale Mikroskopie

Die Mikroskopie in der medizinischen Diagnostik beschränkt sich heute auf *in vitro*-Untersuchungen von Resektaten durch die Pathologie. Der größte Teil dieser Untersuchungen hat die Klassifikation von Neubildungen zum Ziel. Die Resektate sind einerseits ganze Organteile, die postoperativ ausgewertet werden, andererseits aber auch Biopsien mit Volumina von wenigen Kubikmillimetern, deren Auswertung Einfluß auf die unmittelbare Therapie hat und daher auch intraoperativ erforderlich sein kann.

Je nach Priorität und erforderlicher Diagnosequalität vergehen zwischen Entnahme und Befundung eine Stunde bis wenige Tage. Zur Entnahme einer Biopsie ohne offenen Zugang muß die Biopsiezange durch einen Trokar oder den Arbeitskanal eines Endoskops ein- und mit dem Resektat wieder ausgeführt werden. Nach dem Transport

in die Pathologie erfolgt vor dem Mikroskopieren die Präparation durch Anfertigung von 2 μm bis 10 μm dicken Dünnschnitten¹, die zur Kontrastbildung eingefärbt werden, oft beispielsweise mit Hämatoxylin-Eosin².

Aus diesem zeitlich und personell hohen Aufwand resultieren mehrere Nachteile:

- Diagnose und Therapie können in der Regel nicht in derselben Sitzung oder nur mit zeitlicher Verzögerung durchgeführt werden, was zu einer Mehrbelastung des Patienten führt. Personal- und Raumressourcen werden gebunden.
- Üblicherweise können nur wenige Biopsien genommen werden, insbesondere ist ein Screening ganzer Gewebeareale nicht denkbar.
- Eine interaktive Auswahl der zu biopsierenden Stelle ist nicht möglich, weil die Auswertung der gerade entnommenen Biopsie noch nicht vorliegt. Dadurch hängt die Qualität der Auswahl stark von der Erfahrung des Arztes ab.
- Regelmäßiges, invasives Biopsieren, wie es bei der Vierquadrantenbiopsie im Ösophagus erforderlich ist, kann aufgrund von Narbenbildung eine künftige visuelle Beurteilung des betroffenen Gewebes beeinträchtigen oder unmöglich machen.

Die Bedeutung der minimalinvasiven Operationsmethoden nimmt aufgrund der durch den technischen Fortschritt bedingten Erweiterung des Operationsspektrums und der erhöhten Nachfrage durch den Patienten zu. Vor allem werden durch die steigende Akzeptanz von Vorsorgeuntersuchungen häufiger Neubildungen in Frühstadien erkannt und dadurch noch minimalinvasiv und mit besseren Überlebensraten therapiert werden können. Künftig werden somit immer mehr Biopsien ohne offenen Zugang, also laparoskopisch oder endoskopisch, gewonnen werden.

Es besteht daher medizinisches und wirtschaftliches Interesse an einer noninvasiven und instantanen Biopsietechnik. Der Pathologe könnte dabei telemedizinisch in die Diagnose einbezogen werden. Dies macht es erforderlich, endoluminal³ mikroskopieren zu können.

1.1.1 Definition der endoluminalen Mikroskopie

Endoluminale Mikroskopie bezeichne also die diagnostische Mikroskopie zur Darstellung der Gewebemorphologie mit zellulärer bis subzellulärer Auflösung innerhalb eines Hohlorgans des lebenden Organismus ohne Resektion. Die zur Erstellung solcher optischer Schnitte abzubildenden Ebenen sollen dabei lateral-lateral (parallel zur Geweboberfläche) oder axial-lateral (in die Tiefe) gelegt werden.

¹Man unterscheidet zwischen Gefrier- und Paraffinschnitten, je nachdem, ob die zum Schneiden erforderliche Stabilisierung des Gewebes durch Einfrieren oder Infiltration von Paraffin erfolgt.

²Hämatoxylin färbt das Zytoplasma rosa, Eosin färbt die Zellkerne blau-violett.

³gr. *endon* innen; lat. *lumen* Hohlraum (in einem Organ oder zwischen mehreren Organen)

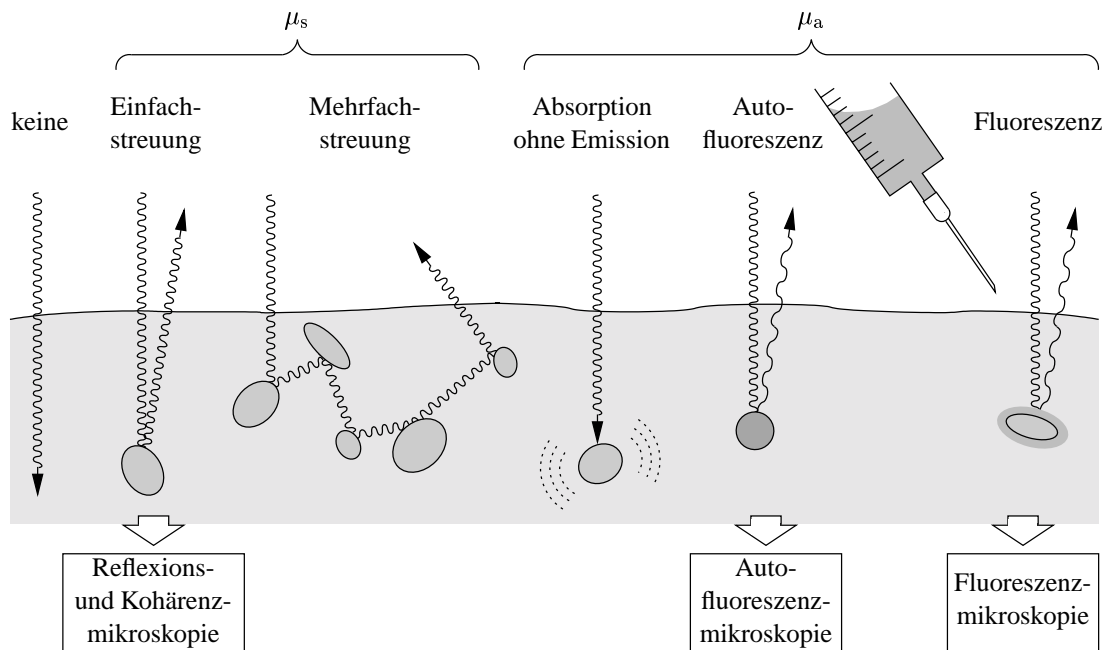


Abbildung 1.1 Wechselwirkungen zwischen Photonen und Gewebe. Diese lassen sich in Streu- und Absorptionsprozesse unterteilen. Abhängig vom Wechselwirkungsprozess erfolgt die Einteilung der verschiedenen konfokalen Mikroskopieverfahren.

Aus dieser Definition folgt unmittelbar, daß ein endoluminales Mikroskop immer ein Auflichtmikroskop sein muß. Denn die das Gewebe beleuchtende Apertur kann anatomisch bedingt nicht außerhalb des zu untersuchenden Hohlorgans positioniert werden. Ferner sind die Proben axial ausgedehnt, so daß ohnehin nicht – wie in der Pathologie üblich – in Transmission gearbeitet werden könnte.

Die axiale Ausdehnung der Proben macht ein tomographisches Mikroskopieverfahren erforderlich, das trotz der optischen Eigenschaften von Gewebe kontrastreiche Bilder liefert. Dieses Verfahren muß in Form einer endoskopischen Sonde miniaturisierbar sein, und es muß zügig und für den Patienten verträglich angewendet werden können. Die praktische Umsetzung der endoluminalen Mikroskopie bleibt somit aus physikalischen, technischen und medizinisch-ökonomischen Gründen eine Herausforderung.

1.1.2 Optische Eigenschaften von Gewebe

Von Seiten der Physik erschweren einige der optischen Eigenschaften von Gewebe (Wilson und Jacques 1990; Tuchin 2000) die Bildgebung.

Die Wechselwirkungen von Photonen mit Gewebe lassen sich in Absorption und Streuung einteilen (Abbildung 1.1). Endogene und applizierte Moleküle (Wilson und Jacques 1990) sind primär für die Absorption verantwortlich, während die Streuung durch Brechungsindexvariationen innerhalb von Zelle oder Zellverband verursacht wird.

	typischer Wert	Mucosa		
		Ösophagus	Magen	Colon
Absorptionskoeffizient μ_a [mm ⁻¹]	0,01 bis 1	0,11	0,28	0,27
Streukoeffizient μ_s [mm ⁻¹]	10 bis 100	8,3	73,2	3,9
Anisotropieparameter g [1]	0,7 bis 1	0,86	0,91	0,91
mittlere freie Weglänge μ_t^{-1} [μm]		119	14	240
effektive Eindringtiefe μ_{eff}^{-1} [mm]		1,54	0,42	1,41
Brechungsindex n [1]		1,37	1,38	1,38

Tabelle 1.1 Typische Werte des Absorptions- und Streukoeffizienten von humanem Gewebe für $600 \text{ nm} < \lambda < 1300 \text{ nm}$ (Wilson und Jacques 1990), Messungen an der Mucosa einiger Hohlorgane des Verdauungstraktes bei 1064 nm (Müller und Roggan 1995) und mittlere Brechungsindizes für 456 nm bis 1064 nm (Wilson und Jacques 1990). Aus diesen Daten wurde jeweils die mittlere freie Weglänge und nach Gleichung (1.2) die effektive Eindringtiefe berechnet.

Die theoretische Behandlung der optischen Gewebeeigenschaften erfolgt durch analytische Strahlungstransportrechnung und für mehrschichtige Gewebe zunehmend durch Monte-Carlo-Simulationen. Die Ergebnisse werden durch Streu- und Absorptionsmessungen experimentell überprüft. Die wichtigsten charakterisierenden Parameter sind der Absorptionskoeffizient μ_a und der Streukoeffizient μ_s . Sie bezeichnen die Strahlungsenergieverlusten aufgrund von Absorption und Streuung pro Photonenweglänge. In dem Extinktionskoeffizienten $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ ist die totale Strahlungsverlustrate gegeben. Die Abschwächung eines Laserstrahls der Intensität I_0 beim Durchgang durch ein Gewebe der Dicke z wird durch das BEER-LAMBERTSche-Gesetz

$$I(z) = (1 - R_F) I_0 \exp(-\mu_t z) \quad (1.1)$$

beschrieben (Tuchin 2000). Dabei ist $I(z)$ die Intensität in ursprünglicher Strahlrichtung nach Durchgang durch das Gewebe, und R_F ist der Reflexionskoeffizient der Gewebeoberfläche gemäß Gleichung (1.3). Der Anisotropieparameter g gibt den durchschnittlichen Cosinus des Streuwinkels an. Er fließt in den effektiven Extinktionskoeffizienten

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1 - g))} \quad (1.2)$$

ein, der die Einflüsse von Absorption und Streuung zusammenfaßt und dessen Kehrwert μ_{eff}^{-1} als effektive Eindringtiefe definiert ist. Analog ist μ_t^{-1} die mittlere freie Weglänge eines Photons. Der Streukoeffizient liegt in Gewebe immer über dem Absorptionskoeffizienten und kann, wie im Fall der Mucosa des Magens, die mittlere freie Weglänge deutlich herabsetzen (Tabelle 1.1). Die effektive Eindringtiefe ist ein Vielfaches der mittleren freien Weglänge, woran man die Bedeutung der Mehrfachstreuung an der Durchdringung des Gewebes mit Licht erkennt. Ferner werden angesichts des Wertebereiches des Anisotropieparameters die entgegen der Eintrittsrichtung aus dem Gewebe austretenden Photonen überwiegend mehrfach gestreut worden sein. Diese Photonen bilden einen Signaluntergrund, der die Dynamik eines bildgebenden Verfahrens reduziert.

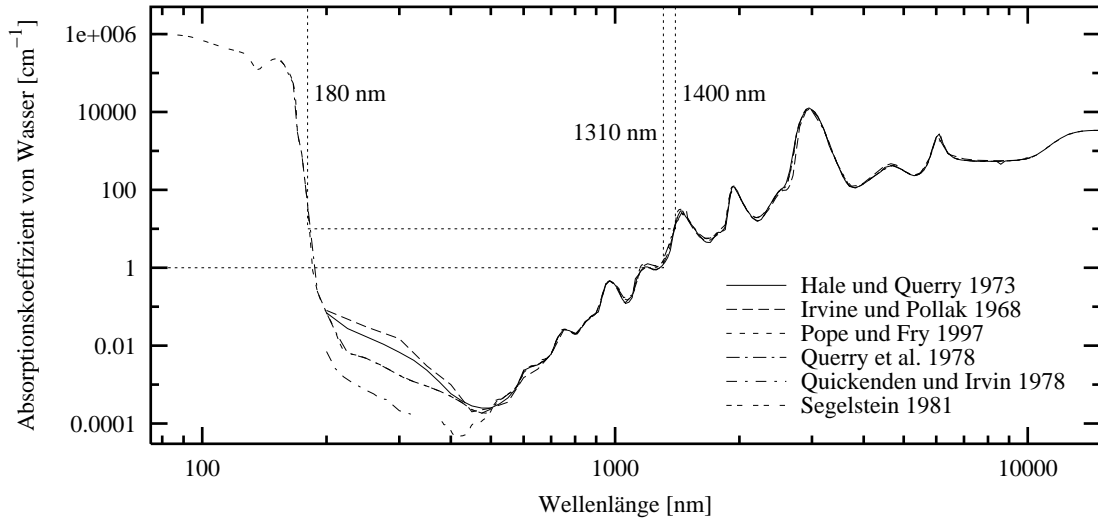


Abbildung 1.2 Der Absorptionskoeffizient μ_a von Wasser hat bei einer Wellenlänge um 500 nm ein Minimum und steigt zum ultravioletten und infraroten Spektralbereich hin an (Hale und Query 1973; Irvine und Pollack 1968; Pope und Fry 1997; Query u. a. 1978; Quickenden und Irvin 1980; Segelstein 1981). Für $180 \text{ nm} < \lambda < 1400 \text{ nm}$ ist $\mu_a < 10 \text{ cm}^{-1}$. Daraus resultieren gemäß Gleichung (1.2) hohe Eindringtiefen für diesen Spektralbereich, weshalb er auch als optisches Fenster bezeichnet wird.

Die Koeffizienten μ_a und μ_s sind wellenlängenabhängig. Im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich wird μ_a für Gewebe durch das Absorptionsspektrum von Wasser (Abbildung 1.2) beeinflusst, wodurch sich für die Bildgebung im Gewebe im sichtbaren und infraroten Spektralbereich das sogenannte *optische Fenster* mit entsprechend hohen Eindringtiefen ergibt. Der Streukoeffizient μ_s unterliegt der Theorie der MIE-Streuung, welche die Streuung allgemein für verschieden große Streuzentren beschreibt (Hecht 1999a; Tuchin 2000). Streuzentren in der Größenordnung der Wellenlänge zeigen kaum wellenlängenabhängige Streuung. Für Zellstrukturen, die deutlich kleiner als die Wellenlänge λ sind, gilt dagegen der Spezialfall der RAYLEIGH-Streuung, bei der die gestreute Intensität proportional zu λ^{-4} ist (Born u. a. 1993).

Der Reflexionskoeffizient für einen unpolarisierten, senkrecht durch eine Grenzfläche von einem Medium mit Brechungsindex n_1 in eines mit Brechungsindex n_2 übergehenden Lichtstrahl ist (Hecht 1999b)

$$R_F = \left(\frac{n_2 - n_1}{n_2 + n_1} \right)^2. \quad (1.3)$$

Innerhalb eines Zellverbandes des Verdauungstraktes variiert $|n_1 - n_2|$ nur um etwa 0,05 (Abbildung 1.3). Nimmt man für $n_1 + n_2 \approx 2 \cdot 1,38$ an, so ist innerhalb des Verdauungstraktes mit $R_F < 2\%$ zu rechnen. Dies erklärt die geringen Werte der Streukoeffizienten der einzelnen Gewebe und damit auch zum Teil die geringen Werte der totalen Strahlungsverlusten, aufgrund derer Gewebe primär ein Phasenobjekt ist. Die einzelne Zelle verändert die Wellenfront, moduliert die Intensität aber kaum⁴.

⁴Über diese Eigenschaft kann der Streukoeffizient μ_s wellenoptisch interpretiert werden. Man be-

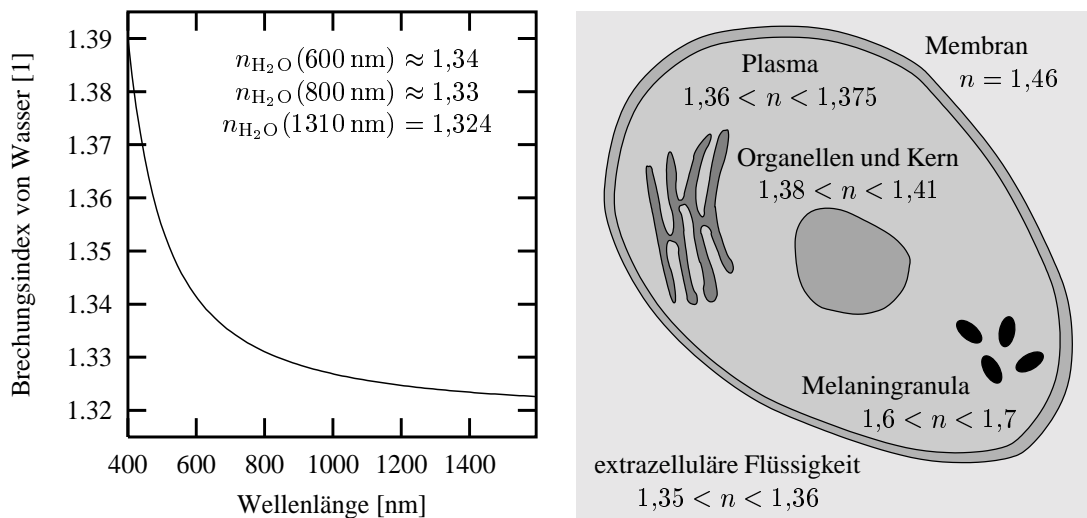


Abbildung 1.3 Links: Brechungsindex $n_{\text{H}_2\text{O}}$ von Wasser abhängig von der Lichtwellenlänge λ gemäß der Beziehung $n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,3199 + 6878/\lambda^2 - 1,132 \cdot 10^9/\lambda^4 + 1,11 \cdot 10^{14}/\lambda^6$ (Kohl u. a. 1995). Rechts: Brechungsindizes einzelner Zellbestandteile (Dunn u. a. 1997; Drezek u. a. 1999). In Zellverbänden ohne extrazelluläres Medium tragen hauptsächlich der Kern und größere Organellen wie Mitochondrien, Lysosome und Peroxisome zur Streuung bei (Tuchin 2000). Da ferner innerhalb des Verdauungstraktes Melanin keine Rolle spielt, kann dort der Brechungsindexunterschied zwischen Organellen und Plasma von maximal $1,41 - 1,36 = 0,05$ als Obergrenze für $|n_2 - n_1|$ angenommen werden.

Für einen Übergang von Wasser in Gewebe ergibt sich (Abbildung 1.3) ferner mit $n_{\text{H}_2\text{O}}(1310 \text{ nm}) = 1,324$ und dem Brechungsindex der Zellmembran ein Reflexionskoeffizient $R_F \approx 5\%$.

1.1.3 Verfahren für die endoluminale Mikroskopie

Für die auflichtmikroskopische Abbildung einer in einem Gewebevolumen liegenden Objektebene sind nur jene Photonen verwertbar, die unmittelbar nach ihrer Wechselwirkung mit der abzubildenden Struktur detektiert werden. Erfahren diese Photonen vor ihrer Detektion jedoch weitere Wechselwirkungen, so verlieren sie die Information über die Strukturen der Objektebene und tragen zu einem homogenen⁵ Signaluntergrund bei. Mit zunehmendem Abstand der Objektebene von der Gewebeoberfläche nimmt der bei der Auflichtmikroskopie detektierte Anteil an ungestreuten Photonen aus der Objektebene ab. Damit verschlechtert sich das Verhältnis zwischen Signal und Untergrund.

Einen vielfachen Beitrag zum Untergrund leisten solche Photonen, die gar nicht mit Strukturen der Objektebene wechselwirkten, sondern aus anderen Ebenen aufgrund

merke, daß dieser gerade bei Geweben hoher Zelldichten zunimmt (Tabelle 1.1).

⁵Es wird vorausgesetzt, daß die in das Gewebe eingebrachte Lichtleistung und der detektierte Raumwinkel groß genug sind, um Photonenrauschen vernachlässigen zu können.

von Einfach- oder Mehrfachstreuung zur Detektion gelangen konnten. Verantwortlich hierfür ist das ungünstige Verhältnis zwischen mittlerer freier Weglänge und effektiver Eindringtiefe. Dadurch verhindert der Untergrund selbst an der Oberfläche einer axial ausgedehnten Gewebeprobe eine erfolgreiche Abbildung zellulärer Strukturen bei Verwendung eines konventionellen Auflichtmikroskops⁶.

Der Wechselwirkungsprozeß, durch den die das Signal bildenden Photonen entstehen, beeinflußt das Verhältnis zwischen Signal und Untergrund nicht, solange er im gesamten Gewebevolumen gleich effizient ist. Insofern können Färbe- oder Fluoreszenztechniken oder auch der Einsatz eines Phasenkontrastmikroskops (Born u. a. 1993) allein den Kontrast bei axial ausgedehnten Proben nicht verbessern. Dies betrifft insbesondere die Chromoendoskopie mit videobasierten Lupen- und Vergrößerungsendoskopen.

Offenbar ist es für die endoluminale Mikroskopie erforderlich, den Anteil des durch Streulicht verursachten Untergrunds zu reduzieren.

Dies kann ein konfokales Mikroskop leisten, wie in Abschnitt 2.1 gezeigt werden wird. Das konfokale Mikroskop ist *in vitro* im Labor als tischgroßes Gerät zur Erstellung optischer Schnitte in biologischem Gewebe etabliert (Wilson 1990; Pawley 1995). Die konfokale Auflichtmikroskopie ist miniaturisierbar (Abschnitt 1.1.5) und daher eine Basistechnologie für die endoluminale Mikroskopie. Das mit einem konfokalen Auflichtmikroskop erzielte Abbildungsergebnis hängt deutlich von der Wechselwirkung ab, aus der die zum Signal beitragenden Photonen hervorgegangen sind. Je nach Ausführung werden Photonen detektiert, die entweder einfach rückgestreut, also reflektiert, wurden, oder die durch Fluoreszenzemission oder Autofluoreszenzemission entstanden sind (Abbildung 1.1). Entsprechend wird in dieser Arbeit zwischen Reflexionsmikroskopie, Autofluoreszenz- und Fluoreszenzmikroskopie unterschieden. Die optische Kohärenzmikroskopie detektiert wie die Reflexionsmikroskopie reflektierte Photonen, jedoch verwendet sie zusätzlich einen interferometrischen Kohärenzfilter zur Kontrastverstärkung.

Bei der vielversprechenden Mehrphotonenmikroskopie bleibt die Fluoreszenz- oder Autofluoreszenzemission auf den Fokus beschränkt, weil eine Mehrphotonenangeregung entsprechend hohe Energiedichten voraussetzt. Dadurch ist prinzipbedingt ein Streulichtuntergrund nahezu nicht vorhanden. Dies birgt gegenüber der konfokalen Mikroskopie einige Vorteile⁷. Die Mehrphotonenmikroskopie ist jedoch im Bezug auf die Strahlquelle anspruchsvoller⁸ und im Hinblick auf eine *in vivo*-Anwendung zumindest derzeit problematisch (Abschnitt 1.1.4).

⁶Experimentell wird dies beispielsweise daran sichtbar, daß die Membranen oberflächlicher Zellen der lebenden menschlichen Hand auch mit einem aufgrund seiner Auflösung geeigneten Lichtmikroskop (Zeiss Axiolab mit Axioplan 40× / 0,65 als Auflichtmikroskop) nicht dargestellt werden können.

⁷Ohne Streulichtuntergrund kann die Detektion *non-descanned* erfolgen, was zu einer besseren Fluoreszenzausbeute führt. Da außerhalb des Fokus keine Absorption erfolgt, wird eine etwas höhere Eindringtiefe erreicht und das Ausbleichen mit den damit verbundenen Zellschäden verringert.

⁸Üblicherweise wird ein gepulster, modengekoppelter Ti:Saphir-Laser verwendet. Man kann mit Leistungen unter 15 mW arbeiten und so Gewebeschäden vermeiden (Masters und So 2001).

1.1.4 Ergebnisse fluoreszenzbasierter Verfahren

Im Hinblick auf eine histopathologische Evaluation unterscheidet sich bei der konfokalen Mikroskopie ein auf Fluoreszenz basierendes Signal vorteilhaft von einem auf Reflexion basierendem. Denn applizierte Fluorophore können zelluläre Strukturen wie Membranen und Kerne gezielt färben, wodurch Zellverbände ähnlich wie in der klassischen Histopathologie dargestellt werden (Abbildung 1.4). Dagegen bleiben im Reflexionsbild jene Bestandteile dieser Strukturen unvollständig, welche nur ungenügend in Richtung der detektierenden Apertur reflektieren. Ein auf Reflexion basierendes Signal ist somit mit einer sonographischen Aufnahme vergleichbar und kann ähnlich interpretationsbedürftig sein.

Nachteile der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie liegen in der erforderlichen Einwirkzeit, der Eindringtiefe und vor allem der Toxizität der zu applizierenden Fluorophore. Auch bei langen Einwirkzeiten zwischen 10 min und 2 h (Schnieder u. a. 2001) bleibt die Eindringtiefe auf 50 μm beschränkt. Daher kann ein *Staging* (Anhang C.2.3), also die Bestimmung der Infiltrationstiefe eines Tumors, mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie nicht durchgeführt werden. Eine mit der konventionellen Histologie konkurrenzfähige Bildqualität (König u. a. 2001; Schnieder u. a. 2001) konnte bislang nur unter Verwendung applizierter, toxischer Fluorophore erzielt werden⁹. Favorisiert werden dabei Acridinorange und Syto 17, die beide mutagen sind. Mit nicht-toxischen Fluorophoren wurde bislang kein ausreichender Kontrast zwischen Kern und Plasma erreicht, wenngleich sich aktuell eine Lösung der Farbstoffproblematik für den oberen Verdauungstrakt andeutet (George und Meining 2003).

Auch für die Mehrphotonenmikroskopie sind klinisch zugelassene Fluorophore nicht bekannt. Die wichtigsten körpereigenen Fluorophore sind Serotonin (Mati u. a. 1997) und NAD(P)H (Piston u. a. 1994). NAD(P)H ermöglicht morphologische und funktionelle Bildgebung (Masters und So 2001), wobei deren Aussagekraft aber selbst für das relativ leicht abbildbare Plattenepithel der Haut nicht wesentlich über Ergebnisse (Masters und So 2001) hinausgeht, die mittels konfokaler Reflexionsmikroskopie erzielt wurden. Dies ist übrigens ebenso für die konfokale Autofluoreszenzmikroskopie zu erwarten. Vor diesem Hintergrund scheint zumindest derzeit der technische Mehraufwand (Abschnitt 1.1.3) der Mehrphotonenmikroskopie für die endoluminale Mikroskopie nicht gerechtfertigt.

Demnach wäre also mittelfristig die konfokale Mikroskopie die bevorzugte Basistechnologie für die endoluminale Mikroskopie. Von den konfokalen Verfahren liefert die Fluoreszenzmikroskopie zwar die aussichtsreichste Bildqualität, ist aber angesichts der Toxizität und der langen Einwirkzeit der Fluorophore aus medizinischen und ökonomischen Gründen nicht anwendbar. Das Potential der Autofluoreszenzmikroskopie scheint das der Reflexionsmikroskopie nicht zu übertreffen.

⁹Auch die Farbstoffe der konventionellen Histologie wirken bei Resorption in der Regel für die Zelle, das Organ oder den Organismus toxisch. Immunhistochemische Färbungen arbeiten mit Antikörpern und erlauben so zellspezifische Markierungen, was diagnostisch hochinteressant ist. Die dazu erforderliche Präparation ist aber *in vivo* nicht möglich.

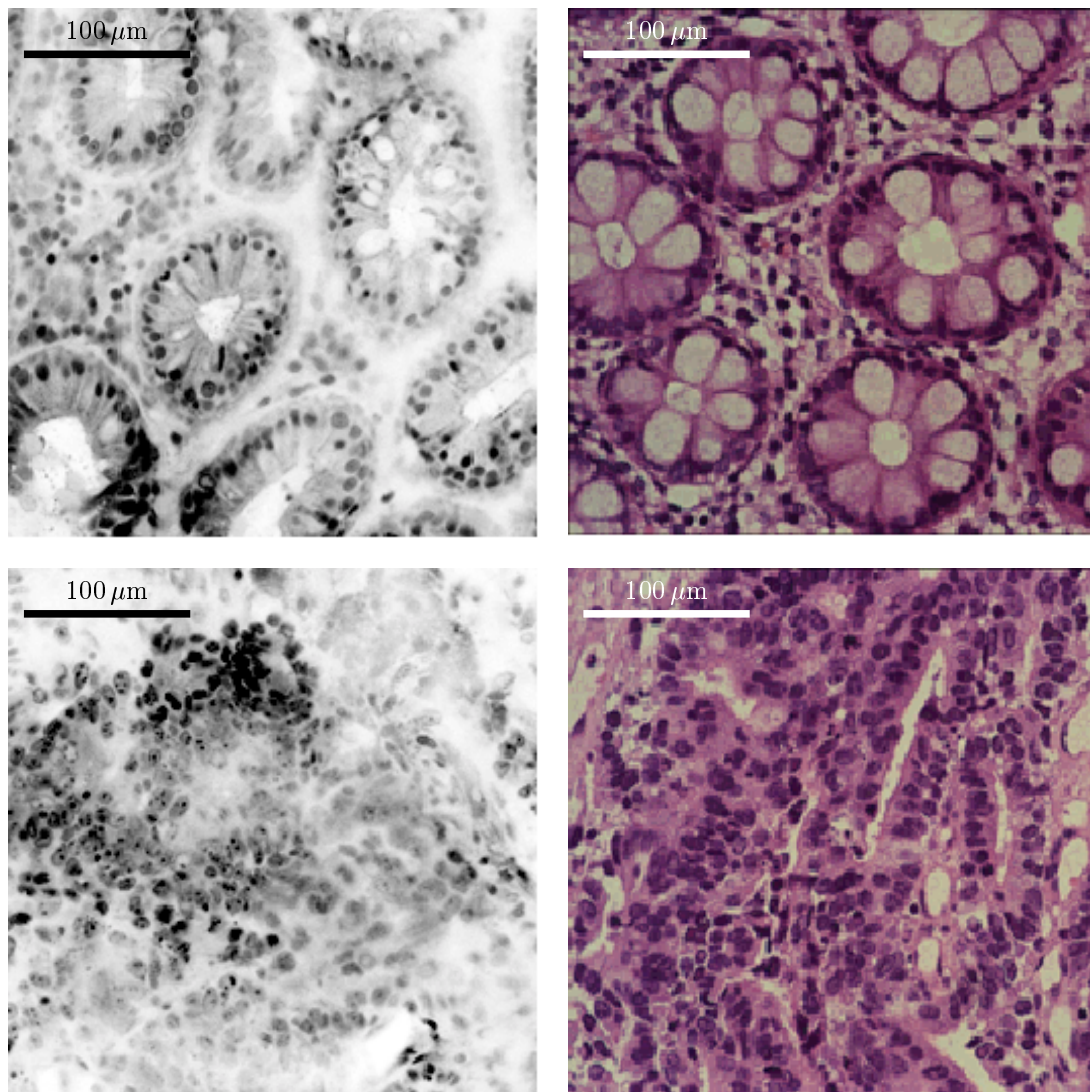


Abbildung 1.4 Vergleich zwischen Fluoreszenzmikroskopie und konventioneller Histologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung am Beispiel einer humanen Colonmukosa (König u. a. 2001). *Links:* Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden in $40\ \mu\text{m}$ Tiefe eines nativen Biopsats aufgenommen. *Rechts:* Die korrespondierenden Präparate stammen jeweils von demselben Biopsat. *Oben:* Bei einer gesunden Stelle sind Kerne, einige Zellgrenzen und die Becherzellen gut zu erkennen. *Unten:* Beim Karzinom löst sich die Kryptenstruktur auf.

1.1.5 Sonden für die endoluminale Mikroskopie

Die technischen Hindernisse bei der Umsetzung der endoluminalen Mikroskopie liegen in der Miniaturisierung eines konfokalen Mikroskops. Neben den Fragen der Sterilisierbarkeit und der Betriebssicherheit nach dem Medizinproduktegesetz ist vor allem die Umsetzung einer Rastereinheit schwierig, die sowohl für die konfokale Mikroskopie als auch für die Mehrphotonenmikroskopie erforderlich ist (Abschnitt 2.1).

Die diskutierten Sonden (Abbildung 1.5) unterscheiden sich prinzipiell dadurch, daß

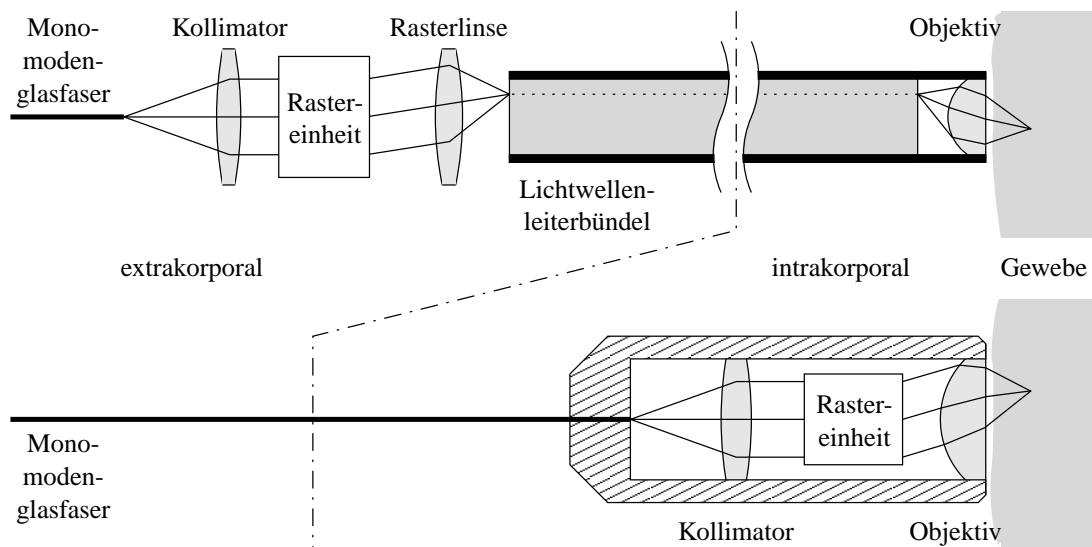


Abbildung 1.5 *Oben:* Extrakorporale Anordnung der für die konfokale Mikroskopie erforderlichen Rastereinheit kombiniert mit einem bildgebenden Lichtwellenleiterbündel. *Unten:* Intrakorporale Anordnung der Rastereinheit.

die Rastereinheit intrakorporal (Dickensheets und Kino 1999a; Hofmann u. a. 1999; Harris 2000; Suga 2002) oder extrakorporal (Sabharwal u. a. 1999; Knittel u. a. 2001) angeordnet werden kann. Die extrakorporale Lösung, basierend auf einem bildgebenden Lichtwellenleiterbündel, erlaubt Sondendurchmesser um 2 mm, womit diese im Arbeitskanal eines flexiblen Endoskops verwendet werden kann. Eine intrakorporale Rastereinheit führt zu deutlich größeren effektiven Sondendurchmessern, welche für die flexible Endoskopie einen Wert von 10 mm nicht wesentlich überschreiten dürfen.

Da aus Kostengründen polarisationserhaltende Lichtwellenleiterbündel nicht zur Verfügung stehen, können Sonden mit extrakorporaler Rastereinheit jedoch nicht für interferometrische Anwendungen verwendet werden, also insbesondere nicht für die optische Kohärenzmikroskopie. Dagegen kann Reflexions-, Fluoreszenz- und Autofluoreszenzmikroskopie mit beiden Sondenarten betrieben werden.

1.2 Zielsetzung

Angesichts der für einen klinischen Einsatz fluoreszenzbasierter endoluminaler Mikroskopie noch nicht gelösten Probleme (Abschnitt 1.1.4) soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit reflexionsbasierte Verfahren diagnostisch relevante Aussagen liefern können. Zwar unterliegen diese den erwähnten Einschränkungen bezüglich der Darstellung der Morphologie, jedoch ergeben sich Vorteile bei der Eindringtiefe und durch den Wegfall der Färbeprozedur.

Dazu wird ein optisches Kohärenzmikroskop im Labor aufgebaut mit dem Ziel, die

Bildgebung für Epithelien des Verdauungstrakts zu untersuchen. Die optische Kohärenzmikroskopie besitzt gegenüber der Reflexionsmikroskopie eine verbesserte Dynamik und eine erhöhte Informationstiefe (Izatt u. a. 1996). Sie kombiniert nämlich die konfokale Mikroskopie (Abschnitt 2.1) mit der aus der optischen Kohärenztomographie bekannten Streulichtfilterung durch ein Kohärenzfilter (Abschnitt 2.2).

Ergänzend zu dieser Zielsetzung werden die für einen klinischen Einsatz notwendigen Modifikationen des Laboraufbaus – darunter auch eine Sonde mit intrakorporaler Rastereinheit – konzipiert und teilweise entwickelt.

Kapitel 2

Optische Kohärenzmikroskopie

In diesem Kapitel werden die für das Verständnis der optischen Kohärenzmikroskopie erforderlichen Grundlagen erstmals als Einheit zusammengestellt. Dabei wird die optische Kohärenzmikroskopie als medizinisches Diagnoseverfahren verstanden, welches die Eigenschaften von konfokaler Mikroskopie und optischer Kohärenztomographie kombiniert. Insofern gehören in erweitertem Rahmen auch die Darstellung der endoluminalen Mikroskopie (Abschnitt 1.1), insbesondere die der optischen Eigenschaften von Gewebe (Abschnitt 1.1.2) und der Sonden für die endoluminale Mikroskopie (Abschnitt 1.1.5), zu einer vollständigen Sicht auf die optische Kohärenzmikroskopie.

Der Begriff der optischen Kohärenztomographie hat sich mittlerweile – meist in Form der Abkürzung OCT (*Optical Coherence Tomography*) – als Diagnoseverfahren primär in der Ophthalmologie etabliert. Für die optische Kohärenzmikroskopie oder OCM (*Optical Coherence Microscopy*) hat sich dagegen aus technologischer Sicht noch kein einheitlicher Sprachgebrauch herauskristallisiert. Ursprünglich wurde der Begriff als die Kombination aus konfokaler Mikroskopie und optischer Kohärenztomographie eingeführt (Izatt u. a. 1996). Diese Definition wird hier übernommen, wenngleich die Bezeichnung auch für nicht-konfokale diagnostische Interferenzmikroskopie mit kurzkohärentem Licht verwendet wird (Dubois u. a. 1999).

2.1 Prinzip des konfokalen Mikroskops

Das konfokale Mikroskop basiert auf Arbeiten von NIPKOW (Nipkow 1884) und wurde erstmals 1957 von MINSKY (Minsky 1961) umgesetzt. Es ist aufgrund seiner effizienten Streulichtunterdrückung eine etablierte Schlüsseltechnik für die Bildgebung in nativen, axial ausgedehnten Gewebeproben (Cha u. a. 1999). Die Streulichtunterdrückung hat ihren Grund in der Punktbildfunktion h_c des konfokalen Mikroskops.

Die dreidimensionale Punktbildfunktion läßt sich durch Kenntnis der lateralen und der axialen Punktbildfunktion erfassen. Nach einer kurzen Erläuterung des Aufbaus und der Funktionsweise des konfokalen Mikroskops wird daher seine laterale Punkt-

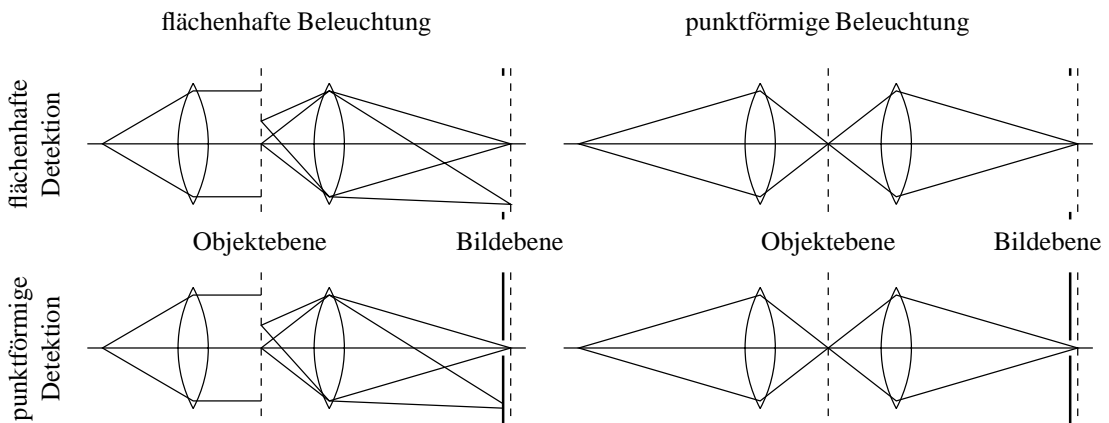


Abbildung 2.1 Verschiedene Konfigurationen für Beleuchtung und Detektion in der Mikroskopie. *Links* wird jeweils die gesamte Objektebene ausgeleuchtet, wohingegen *rechts* das Licht auf einen Punkt des Objektes fokussiert wird. *Oben* wird jeweils die gesamte Bildebene detektiert, während unten aufgrund der Blende eine punktförmige Detektion vorliegt.

bildfunktion berechnet und anschließend die axiale Punktbildfunktion und die damit verbundene Tiefenauflösung hergeleitet.

2.1.1 Aufbau und Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops

Die Abbildungseigenschaften des konfokalen Mikroskops werden wesentlich durch die Wahl der Bildfeldgröße für Beleuchtung und Detektion beeinflusst. Im Extremfall können sowohl die Beleuchtung als auch die Detektion jeweils punktförmig oder flächenhaft implementiert sein (Abbildung 2.1). Von diesen vier möglichen Konfigurationen sind die beiden Kombinationen aus entweder flächenhafter Beleuchtung und punktförmiger Detektion oder punktförmiger Beleuchtung und flächenhafter Detektion selten sinnvoll, wohingegen eine flächenhafte Beleuchtung und Detektion dem konventionellen Lichtmikroskop und eine punktförmige Beleuchtung und Detektion dem konfokalen¹ Mikroskop entspricht.

Beim konfokalen Mikroskop wirkt sich die punktförmige Detektion vorteilhaft auf die axiale Auflösung aus, und wegen der punktförmigen Beleuchtung wird die laterale Auflösung leicht verbessert. Die Reduzierung des Streulichtuntergrundes als wichtigste Eigenschaft des konfokalen Mikroskops ist eine Folge des Zusammenspiels von punktförmiger Beleuchtung und Detektion, denn einerseits wird nur sehr wenig Licht in das Gewebe eingetragen und andererseits die Schärfentiefe durch die axiale Punktbildfunktion verbessert.

Sobald die Beleuchtung oder die Detektion punktförmig wird, ist zur Abbildung eines ausgedehnten Bildfeldes eine Rasterung erforderlich. Diese kann durch Bewegung des Strahls über die Probe oder durch relative Verschiebung der Probe zur optischen Achse

¹Die Brennpunkte (lat. *focus*) von beleuchtender und abbildender Linse fallen zusammen (lat. *con*).

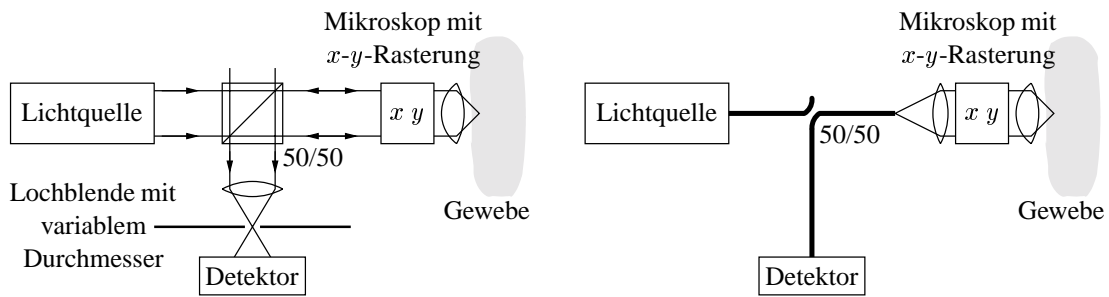


Abbildung 2.2 *Links:* Beim konventionellen konfokalen Rastermikroskop wird die punktförmige Detektion durch eine Lochblende mit variablem Durchmesser realisiert, wodurch man die Konfokalität praktisch stufenlos ein- oder ausschalten kann. *Rechts:* Bei der Umsetzung mit Monomodenlichtwellenleitern fungiert der Grundmodendurchmesser als Lochblende, wodurch ein minimaler Lochblendendurchmesser fest eingestellt ist.

erfolgen. Insofern muß ein konfokales Mikroskop für die endoluminale Mikroskopie ein Rastermikroskop sein.

Der Aufbau eines modernen konfokalen Rastermikroskops (Abbildung 2.2 *links*) umfaßt eine Laserquelle, deren kollimierter Strahl nacheinander einen Strahlteiler und eine Rastereinheit passiert, um durch das Mikroskopobjektiv auf der Probe einen Punkt zu beleuchten. Das dort reflektierte oder emittierte Licht wird von demselben Objektiv gesammelt und nach Rücklauf durch die Rastereinheit über den Strahlteiler der Detektion zugeleitet. Vor dem Detektor befindet sich eine kreisförmige Bildfeldblende. Der Durchmesser dieser Lochblende ist ein wichtiger Parameter zur Einstellung der Tiefenauflösung.

Für ein endoluminales Mikroskop kann eine solche offene und daher starre Strahlführung nicht gewählt werden, da der Verdauungstrakt größtenteils nur über flexible Lichtwellenleiter zugänglich ist. Bei der Umsetzung der konfokalen Auflichtmikroskopie mit Lichtwellenleitern (Abbildung 2.2 *rechts*) wird ein offener Strahlengang nur noch zur Rasterung und mikroskopischen Abbildung benötigt. Dabei fungiert die Eintrittsöffnung des Lichtwellenleiters, die dem probenseitigen Objektiv am nächsten ist, stets als eine Lochblende von kleinstmöglichem Durchmesser. Im Fall einer extrakorporalen Rastereinheit (Abbildung 1.5) ist dies das intrakorporale Ende des gerade beleuchteten Lichtwellenleiterbündels.

2.1.2 Herleitung der lateralen, konfokalen Punktbildfunktion

Die laterale Punktbildfunktion kann für ein konfokales Mikroskop, das mittels Monomodenlichtwellenleitern implementiert ist, mittels der kohärenten Abbildungsgleichung hergeleitet werden. Dazu wird zunächst die konfokale Abbildungsgleichung auf der Basis der FOURIEROPTIK (Anhang A.2) entwickelt, um anschließend auf eine Situation mit Monomodenlichtwellenleitern übertragen zu werden.

Abbildungsgleichung für ein konfokales System

Ein konfokales Mikroskop soll im Rahmen der FOURIEROPTIK als Hintereinanderschaltung zweier isoplanatischer, aberrationsfreier Linsen modelliert werden, die jeweils durch die Punktbildfunktionen h_{01} und h_{12} sowie die Vergrößerungen M_{01} und M_{12} charakterisiert werden (Abbildung 2.3). Die konfokalen Eigenschaften ergeben sich durch die Verteilung der beleuchtenden komplexen Amplitude² $U(x_0, y_0, z_0)$ und durch die komplexe Amplitudentransmission $\mathcal{P}(x_2, y_2)$ der Blende. Die Beleuchtung sei zeitlich kohärent. Wegen der geforderten Isoplanasie kann die Rasterung durch laterales Bewegen des Objekts $\mathcal{O}(x_1, y_1)$ um den Vektor (x, y) erfolgen³. Entsprechend Gleichung (A.12) gilt:

$$U(x_1, y_1, z_1) = \iint_{-\infty}^{\infty} h_{01}\left(x_1 + \frac{x_0}{M_{01}}, y_1 + \frac{y_0}{M_{01}}\right) U(x_0, y_0, z_0) dx_0 dy_0 \quad (2.1)$$

$$U(x_2, y_2, z_2) = \iint_{-\infty}^{\infty} h_{12}\left(x_2 + \frac{x_1}{M_{12}}, y_2 + \frac{y_1}{M_{12}}\right) U(x_1, y_1, z_1) \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) dx_1 dy_1 \quad (2.2)$$

Einsetzen von Gleichung (2.1) in Gleichung (2.2) liefert die konfokale Abbildungsgleichung (Wilson und Sheppard 1990)

$$U(x_2, y_2, z_2) = \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} h_{12}\left(x_1 + \frac{x_2}{M_{12}}, y_1 + \frac{y_2}{M_{12}}\right) h_{01}\left(x_0 + \frac{x_1}{M_{01}}, y_0 + \frac{y_1}{M_{01}}\right) U(x_0, y_0, z_0) \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) dx_0 dy_0 dx_1 dy_1. \quad (2.3)$$

Für die Punktbildfunktion der beleuchtenden Linse gilt gemäß Gleichung (A.22)

$$h_{01}(x, y) = \exp\left(\frac{ik}{2}\left(\frac{1}{f_o} - \frac{1}{f_c}\right)(x^2 + y^2)\right) M^2 h_{12}(x, y). \quad (2.4)$$

Im Fall des konfokalen Auflichtmikroskops wird dasselbe optische System für Beleuchtung und Detektion verwendet. Daraus resultieren die Randbedingungen

$$d_{o01} = d_{i12} =: f_c \quad (2.5)$$

$$d_{i01} = d_{o12} =: f_o \quad (2.6)$$

$$\frac{1}{M_{01}} = \frac{d_i}{d_o} = M_{12} =: M \quad (2.7)$$

$$h_{12} =: h. \quad (2.8)$$

²Die komplexe Amplitude (Anhang A.2) charakterisiert über ihren Betrag die Amplitude und über ihr Argument die Phasenlage einer Größe des Strahlungsfeldes, beispielsweise der elektrischen Feldstärke.

³Dies deckt auch die beiden Fälle ab, bei denen eine Rasterung durch Bewegen der Lichtquelle oder durch Ablenkung des beleuchtenden Strahls erfolgt. Sie können bei Isoplanasie aufgrund des Verschiebungssatzes (A.11) auf die Bewegung des Objekts zurückgeführt werden.

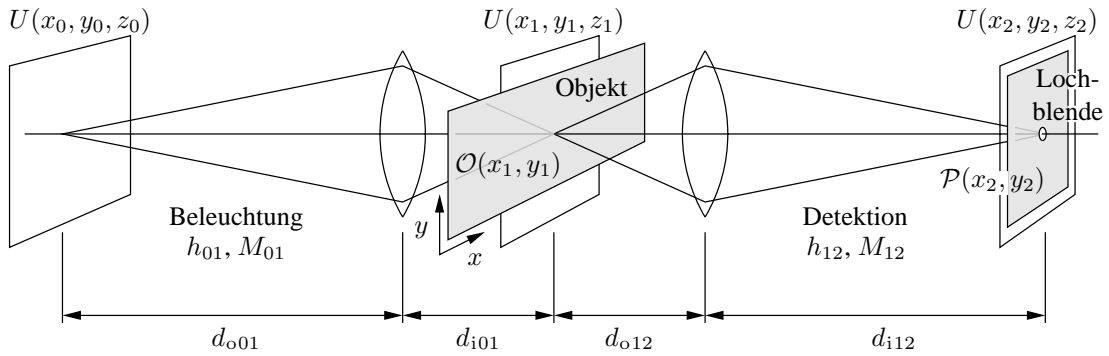


Abbildung 2.3 FOURIERoptisches Modell des konfokalen Mikroskops. Die Rasterung erfolgt durch Bewegung des Objektes.

Üblicherweise besteht ein solches optisches System aus einer Kollimator- und einer Objektivlinse, die beide jeweils für eine unendliche Bild- beziehungsweise Gegenstandsweite optimiert sind (Abbildung 3.6). Die Bezeichnungen f_c und f_o deuten für diesen Fall auf die Brennweiten von Kollimator und Objektiv hin.

Die Anwendung der Gleichungen (2.5) bis (2.4) auf Gleichung (2.3) führt auf die komplexe Amplitude

$$\begin{aligned}
 U(x_2, y_2, z_2) = & \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} h\left(x_1 + \frac{x_2}{M}, y_1 + \frac{y_2}{M}\right) h(x_0 + Mx_1, y_0 + My_1) \\
 & \exp\left(\frac{ik}{2} \left(\frac{1}{f_o} - \frac{1}{f_c}\right) ((x_0 + Mx_1)^2 + (y_0 + My_1)^2)\right) M^2 \\
 & U(x_0, y_0, z_0) \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) dx_0 dy_0 dx_1 dy_1 \quad (2.9)
 \end{aligned}$$

unmittelbar vor der Lochblende $\mathcal{P}(x_2, y_2)$. Bei der Berechnung der nach Passieren der Lochblende detektierten Intensität

$$I(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} |U(x_2, y_2, z_2) \mathcal{P}(x_2, y_2)|^2 dx_2 dy_2 \quad (2.10)$$

kann die Integration über den in Gleichung (2.9) durch die Exponentialfunktion gegebenen Phasenfaktor vernachlässigt werden (Goodman 1968), da optische Detektoren nicht phasensensitiv arbeiten. Bei punktförmiger Beleuchtung

$$U(x_0, y_0, z_0) = U_0 \delta(x_0, y_0) \quad (2.11)$$

und punktförmiger Detektion

$$\mathcal{P}(x_2, y_2) = \delta(x_2, y_2) \quad (2.12)$$

erhält man die Bildintensität

$$I(x, y) = U_0^2 |(h_c \otimes \mathcal{O})(x, y)|^2 \quad (2.13)$$

in Form der kohärenten Abbildungsgleichung als Faltung \otimes aus der konfokalen Punkt- bildfunktion h_c und der Objektinformation \mathcal{O} . Die konfokale Punkt- bildfunktion

$$h_c(x, y) = M^2 h(x, y) h(Mx, My) \quad (2.14)$$

enthält die Punkt- bildfunktion h des konventionellen Mikroskops zweifach als Faktor, was zu einer Verbesserung der lateralen Auflösung führt. Da das optische System als Mikroskop arbeiten soll, kann man $M \geq 1$ voraussetzen. Die Halbwertsbreite der konfokalen Punkt- bildfunktion wird dann für $M = 1$ minimal, also für $f_c = f_o$.

Abbildungsgleichung bei Verwendung eines Monomodenlichtwellenleiters

Nehmen die Beleuchtung $U(x_0, y_0, z_0)$ oder die Lochblende $\mathcal{P}(x_2, y_2)$ lateral ausge- dehnte Verteilungen an, so geht die räumliche Kohärenz des Systems verloren. Damit ist auch die Anwendbarkeit der kohärenten Abbildungsgleichung (2.13) in Frage ge- stellt. In der Regel wäre nun die partiell kohärente Theorie (Sheppard und Wilson 1978; Wilson und Sheppard 1990; Born u. a. 1993) anzuwenden. Für ein auf Mono- modenlichtwellenleitern basierendes konfokales Rastermikroskop bleibt jedoch eine kohärente Abbildungsgleichung gültig (Gu u. a. 1991; Kimura und Wilson 1991).

Die komplexe Amplitude am Ende eines Monomodenlichtwellenleiters der Länge z wird in Form von

$$U(x, y, z) = a_0 f_0(x, y) \exp(i\beta_0 z) \quad (2.15)$$

durch die Modenamplitude a_0 , das Modenprofil $f_0(x, y)$ und die Modenausbreitungs- konstante β_0 charakterisiert (Snyder und Love 1983; Bludau 1998a). Das Modenprofil sei gemäß $\int_{-\infty}^{\infty} |f_0(x, y)|^2 dx dy = 1$ normiert. Die komplexe Amplitude am Ende der Beleuchtungsfaser kann daher als

$$U(x_0, y_0, z_0) = a_0 f_0(x_0, y_0) \quad (2.16)$$

notiert werden. An die Stelle der Lochblende tritt der Eingang des detektionsseiti- gen Lichtwellenleiters, der als kohärenter Detektor wirkt. Die dort anliegende kom- plexe Amplitude $U(x_2, y_2, z_2)$ wird durch die Einkopplung in die Modenamplitude $\int_{-\infty}^{\infty} f_0(x_2, y_2) U(x_2, y_2, z_2) dx_2 dy_2$ überführt. Der ideale Lichtwellenleiter transpor- tiert die komplexe Amplitude gemäß Gleichung (2.15) unverändert zu einem inko- härenten Detektor, dessen Fläche groß im Vergleich zum Modenprofil ist. Dann ergibt sich die gemessene Bildintensität wegen der gewählten Normierung als das Betrags- quadrat der Modenamplitude, also

$$I(x, y) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} f_0(x_2, y_2) U(x_2, y_2, z_2) dx_2 dy_2 \right|^2 \quad (2.17)$$

Einsetzen der Gleichungen (2.9) und (2.16) in Gleichung (2.17) ergibt nach einfacher Rechnung (Anhang A.3.2) eine kohärente Abbildungsgleichung

$$I(x, y) = |(h_f \otimes \mathcal{O})(x, y)|^2 \quad (2.18)$$

und die Punktbildfunktion

$$h_{\text{f}}(x, y) = M^2 ((\hat{h} \otimes f_0)(h \otimes a_0 f_0))(-Mx, -My) \quad (2.19)$$

des konfokalen Mikroskops auf Basis eines Monomodenlichtwellenleiters, wobei

$$\hat{h}(x, y) := h\left(\frac{x}{M}, \frac{y}{M}\right). \quad (2.20)$$

Offenbar ersetzt das Modenprofil f_0 in Gleichung (2.17) nicht einfach die Wirkung der komplexen Amplitudentransmission \mathcal{P} der Lochblende in Gleichung (2.10). Vielmehr sind Integration und Bildung des Betragsquadrates vertauscht. Die kohärente Detektion durch den Monomodenlichtwellenleiter verbirgt sich formal in der Einfachheit von Gleichung (2.15). Physikalisch ist sie in dem relativ zur Wellenlänge geringen Modendurchmesser begründet.

Bei Stufenprofillichtwellenleitern werden die Modenprofile $\{f_\nu\} \mid \nu \in \mathbb{N}$ genähert für Kern und Mantel jeweils durch BESSELFunktionen beschrieben (Bludau 1998a). Das Modenprofil der Grundmode ist rotationssymmetrisch bezüglich der optischen Achse und hat nahezu die Form einer zweidimensionalen GAUSSverteilung. Das aus einem solchen Lichtwellenleiter austretende Strahlenbündel hat eine GAUSSsche Amplitudenverteilung in der Pupillenebene. Man spricht dann von einem GAUSSschen Strahlenbündel.

2.1.3 Tiefenauflösung des konfokalen Mikroskops

Die axiale Punktbildfunktion wird beim konfokalen Mikroskop wesentlich durch den Durchmesser der Öffnung der detektorseitigen Lochblende beeinflusst. Dies wird anhand eines konfokalen Auflichtmikroskops illustriert (Abbildung 2.4). Die Lichtquelle befindet sich im Zentrum der Lochblende. Die Bildebene des Mikroskops ist die zur Lochblende konjugierte Ebene. Ein reflektierendes⁴ Objekt befindet sich intra- oder extrafokal⁵ um den Abstand $|\Delta f|$ defokussiert. Detektiert werde der Anteil der reflektierten Intensität, der durch die Lochblende tritt. Reflexionen an extra- oder intrafokal liegenden Objekten werden nur unscharf auf die Lochblende abgebildet und tragen dadurch bei ausreichend kleiner Blendenöffnung kaum zur detektierten Intensität bei.

Die weitere Diskussion geht von einer punktförmigen Blendenöffnung aus. Für diesen Fall ergibt sich die axiale Punktbildfunktion aus einem einfachen Argument (Corle und Kino 1996), sofern man die Kenntnis der dreidimensionalen Punktbildfunktion einer sphärischen Welle voraussetzt.

Eine sphärischen Welle laufe durch eine kreisförmige Apertur hindurch auf ihr Zentrum $(0, 0, 0)$ auf der optischen Achse zu. Ist α der Winkel, unter dem der Durchmesser

⁴Die folgende Argumentation gilt gleichermaßen für fluoreszierende Objekte, wenngleich der Strahlengang (Abbildung 2.4) für Anregung und Emission angepaßt werden müßte.

⁵Verläßt ein Strahlenbündel ein optisches System konvergent, so liegt der intrafokale Bereich zwischen dem optischen System und der Ebene, welche die Taille des Strahlenbündels enthält. Der extrafokale Bereich ist der Halbraum jenseits dieser Ebene in Richtung der Lichtausbreitung.

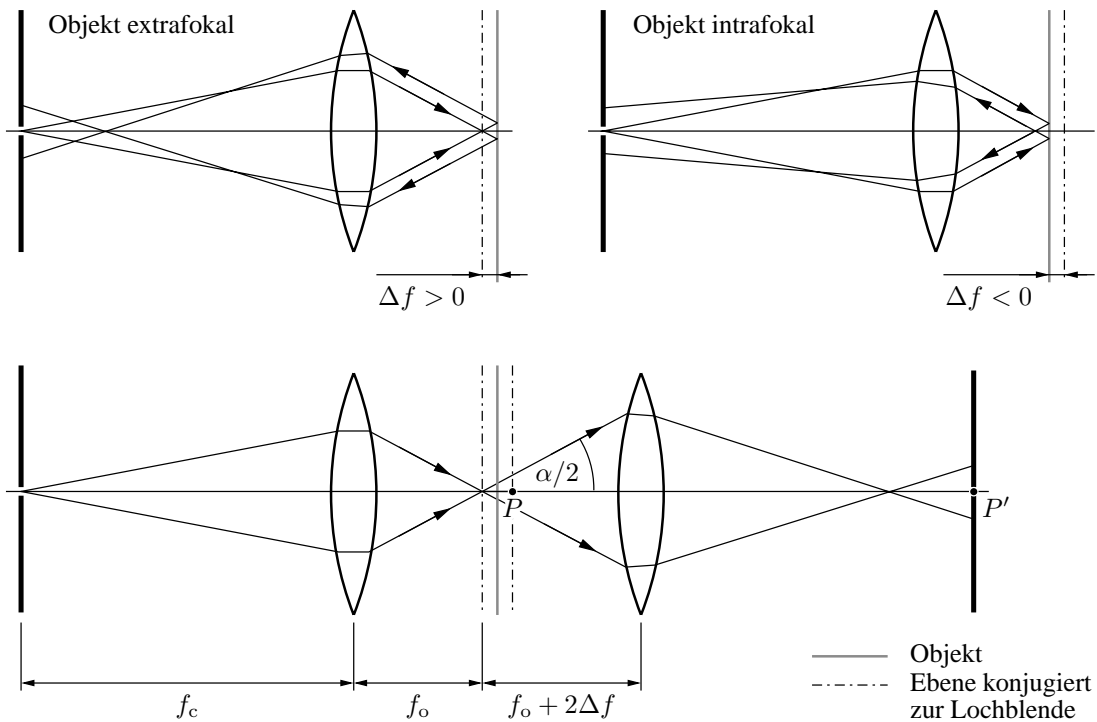


Abbildung 2.4 Die Tiefenauflösung beim konfokalen Mikroskop wird primär durch die detektorseitige Lochblende bewirkt. *Oben:* Situation für ein konfokales Auflichtmikroskop mit intra- und extrafokaler Lage eines reflektierenden Objekts. Das Licht aus defokussierten Ebenen wird größtenteils durch die Lochblende aufgefangen und gelangt so nicht zur Detektion. *Unten:* Zur Herleitung der Tiefenauflösung wurde für ein um Δf extrafokales Objekt der Strahlengang auf dem Rückweg gespiegelt dargestellt. Der Punkt P , der auf die Lochblende P' abgebildet wird, liegt um $2\Delta f$ vom Zentrum der Kugelwelle entfernt.

der Apertur vom Zentrum aus erscheint, so gilt für die Amplitude entlang der optischen Achse

$$U(0, 0, z) \sim \frac{\sin(nu/4)}{nu/4} \quad | \quad u = kz \tan \frac{\alpha}{2}, \quad (2.21)$$

was sich aus der FRESNELtransformation (A.17) herleiten läßt⁶ (Born u. a. 1993). In Gleichung (2.21) ist die Feldverteilung zusätzlich mit dem Brechungsindex n des Mediums, in dem sich das Zentrum befindet, skaliert (Corle und Kino 1996).

Bei einer Defokussierung des reflektierenden Objekts um Δf wird die Amplitudenverteilung, die an der Stelle des Objekts aufgrund der Beleuchtung resultiert, in eine Ebene in der Umgebung der Lochblende vergrößert abgebildet (Abbildung 2.4 unten). Dadurch wird der Punkt P nach P' abgebildet. Daher entspricht die Intensität im Punkt P der detektierten Intensität (Corle und Kino 1996). Für diese gilt bei einer um Δf de-

⁶Die Definition von u (Born u. a. 1993) weicht von einer genaueren (Corle und Kino 1996) ab, ändert jedoch nichts an der Aussage von Gleichung (2.24).

fokussierten der Probe folglich

$$I(\Delta f) \sim |U(0, 0, 2\Delta f)|^2 = \left(\frac{\sin(n k \Delta f \tan \frac{\alpha}{2} / 2)}{(n k \Delta f \tan \frac{\alpha}{2} / 2)} \right)^2 \quad (2.22)$$

Wegen $I(\Delta f) = \frac{1}{2} \iff \Delta f \approx 2,783 / (n k \tan^2 \frac{\alpha}{2})$ erhält man das axiale Auflösungsvermögen als die Halbwertsbreite von $I(\Delta f)$ zu

$$R_{\text{axial}} = \frac{0,89\lambda}{n \tan^2 \frac{\alpha}{2}} \quad (2.23)$$

$$R_{\text{axial}} \approx \frac{0,89\lambda}{(\text{N.A.})^2} \quad \text{für } n = 1 \text{ und } \cos^2 \frac{\alpha}{2} \approx 1. \quad (2.24)$$

Es wird aus dieser Überlegung klar, daß eine Messung der axialen konfokalen Punkt- bildfunktion $I(\Delta f)$ gleichzusetzen ist mit der Messung der axialen Punkt bildfunktion $h_c(z)$ des Objektivs. Insbesondere kann darüber die numerische Apertur bestimmt werden.

2.2 Optische Kohärenztomographie und -mikroskopie

Die optische Kohärenztomographie (Huang u. a. 1991) und -mikroskopie (Izatt u. a. 1996) nutzen eine breitbandige Lichtquelle in Verbindung mit einem MICHELSON- Interferometer für eine tiefenaufgelöste Reflektometrie mit hoher Dynamik. Beide Ver- fahren verwenden dasselbe Meßprinzip, jedoch unterscheiden sie sich bezüglich der Orientierung der Bildebene, der Auflösung und der Meßtechnik.

Im folgenden Abschnitt wird das gemeinsame, interferometrische Meßprinzip beider Verfahren kompakt beschrieben, wobei Vereinfachungen bei der spektralen Leistungs- dichte der Lichtquelle, der Autokorrelationsfunktion und dem Reflexionsvermögen des Objektes vorgenommen werden. Eine ausführliche mathematische Beschreibung er- folgt in den Abschnitten 4.1.3 bis 4.1.5.

2.2.1 Gemeinsames, interferometrisches Meßprinzip

Bei der optischen Kohärenztomographie und -mikroskopie wird ein MICHELSON- Interferometer verwendet, das aus Quellenarm, Probenarm, Referenzarm und Detek- tionsarm besteht (Abbildung 2.5). Es wird mittels eines Lichtwellenleiterkopplers im- plementiert, was zu einer punktförmigen Interferenz führt, die im Detektionsarm durch einen großflächigen Detektor gemessen wird. Im Referenzarm wird das Licht zu einem parallelen Strahlenbündel kollimiert, so daß dort die axiale Punkt bildfunktion stets $h_r(z_r) \equiv 1$ ist und künftig vernachlässigt wird. Das abbildende System im Probenarm habe die Punkt bildfunktion $h_s(x_s, y_s, z_s)$. Nach den Ausführungen aus Abschnitt 2.1.2 kann das System als räumlich kohärent betrachtet werden.

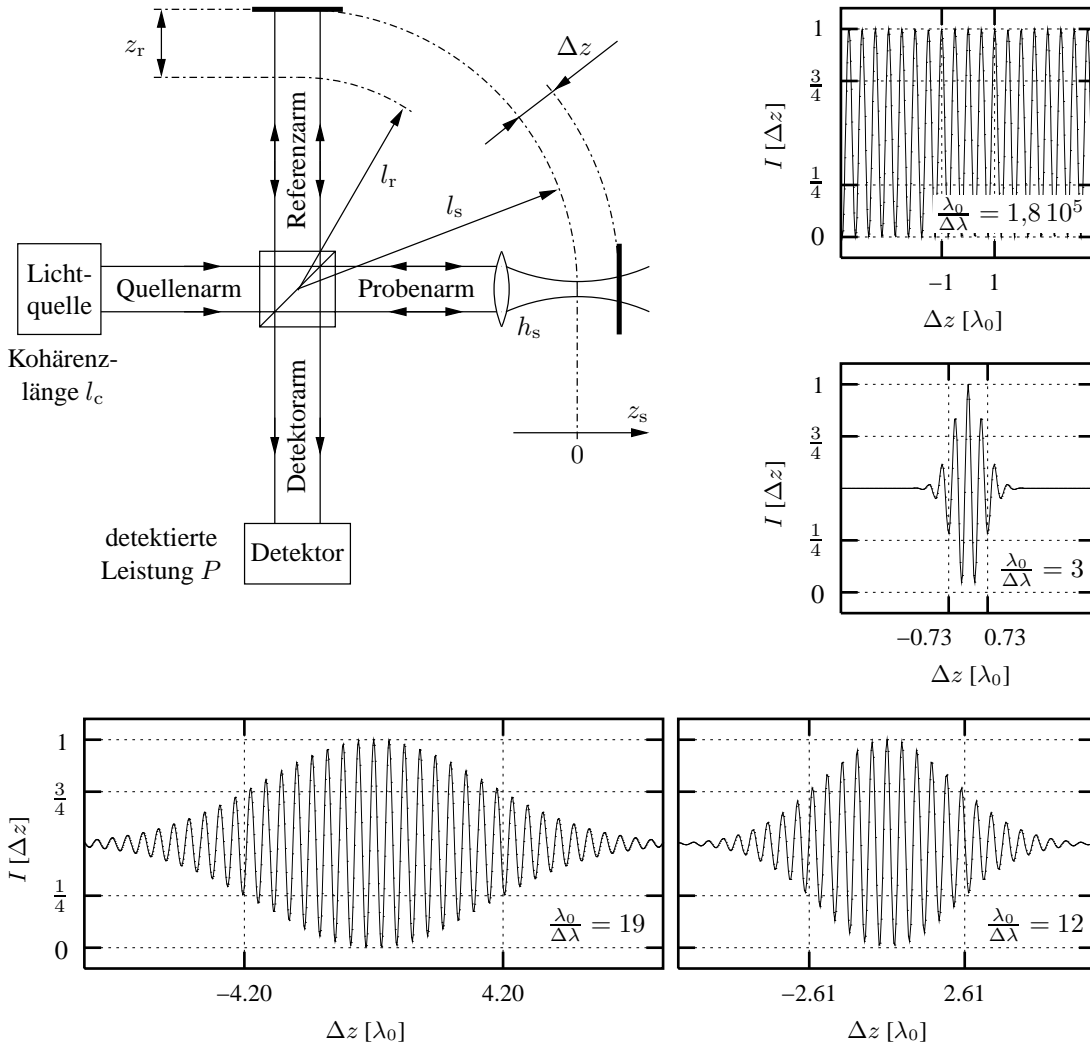


Abbildung 2.5 Interferometrisches Detektionsprinzip bei optischer Kohärenztomographie und -mikroskopie. *Links oben* ein MICHELSON-Interferometer bestehend aus Quellenarm, Probenarm, Referenzarm und Detektorarm. Für endoluminale Systeme wird üblicherweise als Strahlteiler ein Lichtwellenleiterkoppler verwendet (Abbildung 2.6). Hier wurde jedoch eine Darstellung mit offenem Strahlengang gewählt, um die axialen Koordinatensysteme zu verdeutlichen. Die *Graphen* zeigen die Autokorrelationsfunktionen $I(\Delta z) = \frac{1}{2}(1 + p(\Delta z))$ für verschiedene Verhältnisse $\lambda_0/\Delta\lambda$ entsprechend der verschiedenen Lichtquellen aus Tabelle 2.1. Abhängig von dem Verhältnis zwischen Zentralwellenlänge λ_0 und Halbwertsbreite $\Delta\lambda$ der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle ändert sich die Halbwertsbreite der Einhüllenden der Autokorrelationsfunktion.

Die Länge l_s des Probenarmes sei die optische Weglänge zwischen dem Strahlteiler und der Objektivbildebene. Die optische Weglänge zwischen Strahlteiler und Referenzarmspiegel ist $l_r + z_r$, wobei $l_r \approx l_s$. Als Abgleich der Referenzarmlänge soll folglich künftig eine derartige Verschiebung des Referenzarmspiegels gelten, durch die

$$z_r = l_s - l_r \quad (2.25)$$

wird. $\mathcal{R}_s(z_s)$ sei die effektive Reflexionsstärke (Abschnitt 4.1.2) der Probe als Funktion

des Abstands z_s von der Bildebene⁷. Der Referenzarmspiegel habe das Reflexionsvermögen R_r .

Die spektrale Leistungsdichte $S_{\text{src}}(\lambda)$ der Lichtquelle der Lichtausgangsleistung P_{src} sei eine GAUSSfunktion der Halbwertsbreite Δk gemäß Gleichung (A.25)

$$S_{\text{src}}(k) = P_{\text{src}} \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi}\Delta k} \exp\left(-\left(2\sqrt{\ln 2} \frac{k - k_0}{\Delta k}\right)^2\right) \quad (2.26)$$

Als Probe $\mathcal{R}_s(z_s) = R_s^1 \delta(z_s^1)$ diene nun ein Spiegel des Reflexionsvermögens R_s^1 , der im Abstand $l_s + z_s^1$ vom Strahlteiler aufgestellt ist. Das Reflexionsvermögen des Referenzarmspiegels sei $R_r = 1$. Alle optischen Komponenten seien frei von Aberrationen und Vignettierung, und Verluste bleiben unberücksichtigt. Die aus der Interferenz des aus Proben- und Referenzarm zurückkommenden Lichtes auf dem Detektor gebildete Intensität soll in Abhängigkeit der Differenz

$$\Delta z = l_r + z_r - (l_s + z_s^1) \quad (2.27)$$

zwischen Proben- und Referenzarmlänge ermittelt werden.

Die Berechnung der Intensität bei Interferenz partiell kohärenten Lichts erfolgt nachfolgend stets entsprechend der Gleichung (A.4) (Anhang A.1.2)

$$I = \int_{-\infty}^{\infty} I_k S_{\text{src}}(k) dk \quad | \quad I_k = \langle A_k(t) A_k^*(t) \rangle \quad (2.28)$$

aus monochromatischen, komplexwertigen, normierten Amplituden $A_k(t)$, aus deren Betragsquadrat sich nach zeitlicher Mittelung $\langle \cdot \rangle$ über die Integrationsdauer des Detektors die monochromatische Intensität I_k ergibt. Die polychromatische Intensität resultiert schließlich durch Integration der mit der spektralen Leistungsdichte gewichteten monochromatischen Intensitäten. Dies ist gegenüber dem allgemeinen Formalismus zur Berechnung der polychromatischen Intensität (Anhang A.1.1) eine Vereinfachung für stationäre Wellenfelder (Anhang A.1.2). Die Annahme der Stationarität des Wellenfeldes ist für die in dieser Arbeit diskutierten Systeme zur optische Kohärenzmikroskopie erfüllt (Anhang A.1.3).

Ein von der Lichtquelle ausgehender, unendlich langer, monochromatischer Wellenzug der Wellenlänge $\lambda = 2\pi/k$ führt an der Stelle des Detektors zu einer Amplitude

$$A_k = \frac{1}{2} A_0 \exp(i(2k(l_r + z_r) - \omega t)) + \frac{1}{2} h_s(z_s^1) \sqrt{R_s^1} A_0 \exp(i(2k(l_s + z_s^1) - \omega t)) \quad (2.29)$$

als Summe zweier phasenverschobener Wellen gleicher Frequenz. Unter Einbeziehung von Gleichung (A.29) errechnet sich dann die monochromatische Intensität zu

$$I_k = \langle A_k(t) A_k^*(t) \rangle = \frac{A_0^2}{4} (1 + h_s^2(z_s^1) R_s^1 + 2h_s(z_s^1) \sqrt{R_s^1} \cos(2k\Delta z)) . \quad (2.30)$$

⁷Die axiale Lage der Bildebene in der Probe wird durch axiales Verschieben der Probe verändert.

Es resultiert also ein konstanter Untergrund und ein sich mit optischen Weglängenunterschied Δz änderndes, harmonisches Signal. Der Kontrast des Signals wird maximal für $R_s^1 \nearrow 1$. Für Reflexionen aus biologischem Gewebe ist $R_s^1 \approx 2\%$ und der Streifenkontrast entsprechend gering.

Der Übergang zur polychromatischen Interferenz vollzieht sich durch Integration des Produkts aus der monochromatischen, auf $A_0 = 1$ normierten Intensität aus Gleichung (2.30) und der spektralen Leistungsdichte aus Gleichung (2.26) über das gesamte Spektrum. Mit der Integrationseigenschaft aus Gleichung (A.24) ergibt sich die Intensität zu

$$I = \int_{-\infty}^{\infty} I_k S_{\text{src}}(k) dk = \frac{P_{\text{src}}}{4} \left(1 + h_s^2(z_s^1) R_s^1 + 2h_s(z_s^1) \sqrt{R_s^1} \int_{-\infty}^{\infty} \cos(2k\Delta z) S_{\text{src}}(k) dk \right). \quad (2.31)$$

Weil $S_{\text{src}}(k)$ reellwertig ist, gilt

$$p(\Delta z) := \frac{1}{P_{\text{src}}} \int_{-\infty}^{\infty} \cos(2k\Delta z) S_{\text{src}}(k) dk = \frac{\text{Re}(\mathcal{F}(S_{\text{src}}(k))|_{\Delta z})}{P_{\text{src}}}, \quad (2.32)$$

womit sich Gleichung (2.31) zu

$$I = \frac{P_{\text{src}}}{4} \left((1 + h_s^2(z_s^1) R_s^1 + 2h_s(z_s^1) \sqrt{R_s^1} p(\Delta z)) \right) \quad (2.33)$$

abkürzt. Bei der polychromatischen Interferenz erhält das harmonische Signal also eine Einhüllende in Form der Fouriertransformierten der spektralen Leistungsdichte der Lichtquelle. Das in Gleichung (2.32) definierte Interferenzstreifenmuster $p(\Delta z)$ ist der Realteil des komplexen Kohärenzgrads⁸ $\gamma_{\text{rs}}(\Delta z)$ (Born u. a. 1993). Die Einhüllende des Interferenzstreifenmusters ist durch den Betrag

$$|\gamma_{\text{rs}}(\Delta z)| = \frac{p(\Delta z)}{\cos(2k_0\Delta z)} \quad (2.34)$$

des komplexen Kohärenzgrads gegeben. Für die GAUSSförmige spektrale Leistungsdichte aus Gleichung (2.26) errechnet sich unter Verwendung der Gleichung (A.43) das Interferenzstreifenmuster

$$p(\Delta z) = \exp\left(-\left(\frac{2\Delta k \Delta z}{4\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right) \cos(2k_0\Delta z), \quad (2.35)$$

womit die resultierende Einhüllende ebenfalls GAUSSförmig ist. Die Halbwertsbreite der Einhüllenden ist die Kohärenzlänge (Izatt u. a. 1996)

$$l_c = \frac{4 \ln 2}{\Delta k} = \frac{2\lambda_0^2 \ln 2}{\pi \Delta \lambda} \quad (2.36)$$

⁸Im Fall des optischen Kohärenzmikroskops könnte auch präzisierend der Begriff des komplexen zeitlichen Kohärenzgrads (Hecht 1999c) verwendet werden, da räumliche Kohärenz gegeben ist.

Lichtquelle	λ_0 [nm]	$\Delta\lambda$ [nm]	l_c [μm]	$\lambda_0/\Delta\lambda$ [1]
Festkörperlaser Laser 2000 GLC-532-S	532	0,003	4000	$1,8 \cdot 10^5$
Ti:Saphir-Laser	800	260	1,1	3
Weißlicht	600	200	0,8	3
Superlumineszenzdioden Superlum SLD 47	900	75	4,7	12
Superlumineszenzdioden AFC BBS 1310B-TS	1310	69	11,0	19

Tabelle 2.1 Spektrale Eigenschaften verschiedener Lichtquellen. Die zugehörigen Autokorrelationsfunktionen zeigt Abbildung 2.5.

der Lichtquelle. Sie verhält sich reziprok zur Halbwertsbreite Δk des Spektrums. Mit Gleichung (2.33) ist für $A = 1$, $R_s^1 = 1$ und $h_s(z_s^1) = 1$ die Autokorrelationsfunktion⁹ $I(\Delta z) = \frac{1}{2}(1 + p(\Delta z))$ der Lichtquelle gegeben (Tabelle 2.1 und Abbildung 2.5). Für eine bei $\Delta z = 0$ abgegliche Referenzarmlänge erhält man die kohärente Überlagerung, während für $|\Delta z| \gg l_c$ die kohärenten Anteile zugunsten der inkohärenten Summe der Leistungen aus den Interferometerarmen vernachlässigbar sind.

Der Betrag des komplexen Kohärenzgrades in Form der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters ist ein Maß für das Reflexionsvermögen der Probe. Optische Kohärenztomographie und -mikroskopie messen beide die Intensität der Einhüllenden. Dabei wird der inkohärente Untergrund herausgefiltert. Dies führt bereits für eine axial nicht ausgedehnte Probe zu einer verbesserten Dynamik gegenüber einer konventionellen, nicht-interferometrischen Reflektometrie. Bei axial ausgedehnten Proben wird ferner gestreutes Licht nur dann detektiert, wenn es innerhalb der Probe aus einem axialen Intervall der Größenordnung der Kohärenzlänge reflektiert wurde, welches im Bezug auf die Referenzarmlänge als abgeglichen im Sinne von Gleichung (2.25) gilt. Diese Eigenschaft zur Unterdrückung von Streulicht wird als Kohärenzfilter¹⁰ bezeichnet.

Das Detektionsprinzip basiert bei optischer Kohärenztomographie und -mikroskopie auf Modulation und Demodulation. Dazu wird der Referenzarm derart definiert bewegt und dadurch auf dem Detektor das Interferenzstreifenmuster durchfahren, daß eine Intensitätsmodulation bei einer durch die Referenzarmbewegung definierten Frequenz auftritt. Auf dieser Frequenz erfolgt dann eine Demodulation des Detektorsignals zur Bestimmung der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters.

2.2.2 Optische Kohärenztomographie

Bei der optischen Kohärenztomographie liegt die Bildebene axial-lateral (Abbildung 2.6). Die axiale Rasterung erfolgt durch eine lineare Bewegung des Referenzarms.

⁹Die Autokorrelationseigenschaft ist anschaulich verständlich, wenn man bedenkt, daß man zur Messung von $I(\Delta z)$ durch eine lineare Änderung des optischen Weglängenunterschiedes Δz das aus Proben- und Referenzarm kommende Licht der Quelle im Detektionsarm gegeneinander verschiebt.

¹⁰engl. *coherence gate*

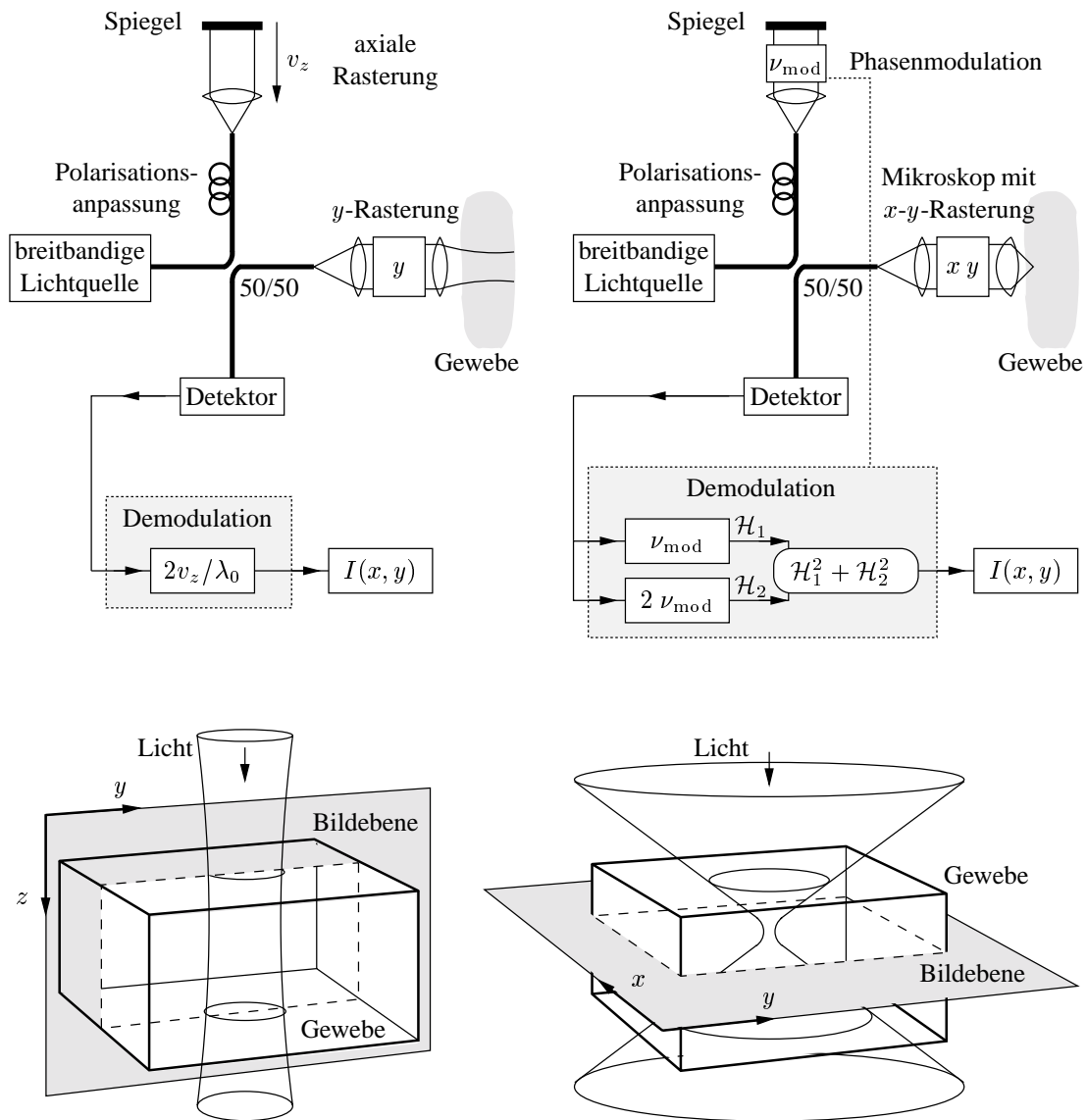


Abbildung 2.6 Optische Kohärenztomographie und -mikroskopie basierend auf einem Interferometer aus Lichtwellenleitern. *Links:* Bei der optischen Kohärenztomographie liegt die Bildebene axial-lateral, wobei die schnelle Rasterung axial durch Verfahren des Referenzarmspiegels mit der Geschwindigkeit v_z erfolgt. Die numerische Apertur der Objektivlinse ist klein, so daß sich die Schärfentiefe über die gesamte Informationstiefe erstreckt. *Rechts:* Bei der optischen Kohärenzmikroskopie liegt die Bildebene lateral-lateral, so daß ein Objektiv hoher numerischer Apertur verwendet werden kann. Zur Kontrastmessung wird im Referenzarm eine Phasenmodulation eingeführt, was eine komplexere Demodulation erforderlich macht.

Nach jeder axialen Rasterbewegung wird der Strahl in der Probe lateral versetzt. Insofern ist die optische Kohärenztomographie direkt mit dem bildgebenden Ultraschall vergleichbar, mit dem Unterschied, daß Licht anstelle von Schall verwendet wird. Da die Reflexionen axial gleichberechtigt detektiert werden sollen, hat das Objektiv eine geringe numerische Apertur.

Die Demodulationsfrequenz ergibt sich bei der optischen Kohärenztomographie aus der mittleren Lichtwellenlänge λ_0 und der axialen Verfahrensgeschwindigkeit v_z des Referenzarms. Eine Periode aus destruktiver und konstruktiver Interferenz entsteht auf dem Detektor, wenn man den Referenzarm um $\lambda_0/2$ verfährt, so daß die Streifenfrequenz bei $2v_z/\lambda_0$ liegt. Die Verfahrensgeschwindigkeit liegt bei $v_z = 33 \text{ mm/s}$, bei dispersiv arbeitenden Verzögerungsstrecke wurden aber auch schon $v_z = 40 \text{ m/s}$ (Rollins u. a. 1998) erreicht, was Bildgebung in Videorate ermöglicht.

2.2.3 Optische Kohärenzmikroskopie

Bei der optischen Kohärenzmikroskopie erfolgt die Rasterbewegung bei der Bildaufnahme lateral-lateral (Abbildung 2.6). Um eine hohe laterale Auflösung zu erreichen, wird ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur gewählt. Proben- und Referenzarm müssen abgeglichen sein. Die Bildebene stimmt mit der Fokalebene des Objektivs überein, so daß $z_s = 0$ und also $h_s(z_s) = 1$.

Der optische Weglängenunterschied Δz zwischen Proben- und Referenzarm würde sich dann nur noch ändern, wenn die axiale Position der Reflexion des Objekts bildfeldabhängig variiert. Insbesondere wäre es nicht möglich, die Einhüllende des Interferenzstreifenmusters und damit das Reflexionsvermögen der Probe zu messen. Abhilfe schafft ein homodynes Meßverfahren, für das eine Phasenmodulation im Referenzarm eingeführt wird (Jackson und Jones 1989; Izatt u. a. 1996).

Gemäß der Gleichungen (2.33) und (2.35) läßt sich etwa für $\lambda_0/\Delta\lambda > 10$ in der Nähe von $\Delta z = 0$ die Intensität nähern zu

$$I \approx \frac{P_{\text{src}}}{4} \left((1 + R_s + 2\sqrt{R_s} \cos(k_0 2\Delta z)) \right) \quad (2.37)$$

Durch Einführen einer Modulation der Referenzarmlänge durch

$$\Delta z \longrightarrow \Delta z + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t) \quad (2.38)$$

wird aus Gleichung (2.37)

$$I \approx \frac{P_{\text{src}}}{4} \left(1 + R_s + 2\sqrt{R_s} \cos(2k_0(\Delta z + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t))) \right). \quad (2.39)$$

Mit der Phase der Ruhelage der Modulation

$$\varphi_{\text{mod}} = 2k_0 \Delta z \quad (2.40)$$

ist ein Arbeitspunkt auf dem Interferenzstreifenmuster gegeben, um den herum die Phasenmodulation ein periodisches Signal auf dem Detektor erzeugt (Abbildung 2.7). Dieses Detektorsignal enthält Oberfrequenzen der Modulationsfrequenz, deren Anteile von der Phasenlage des Arbeitspunktes und der Modulationsamplitude abhängen. Unter Verwendung der Gleichung (A.32) schreibt man Gleichung (2.39) als eine Reihe

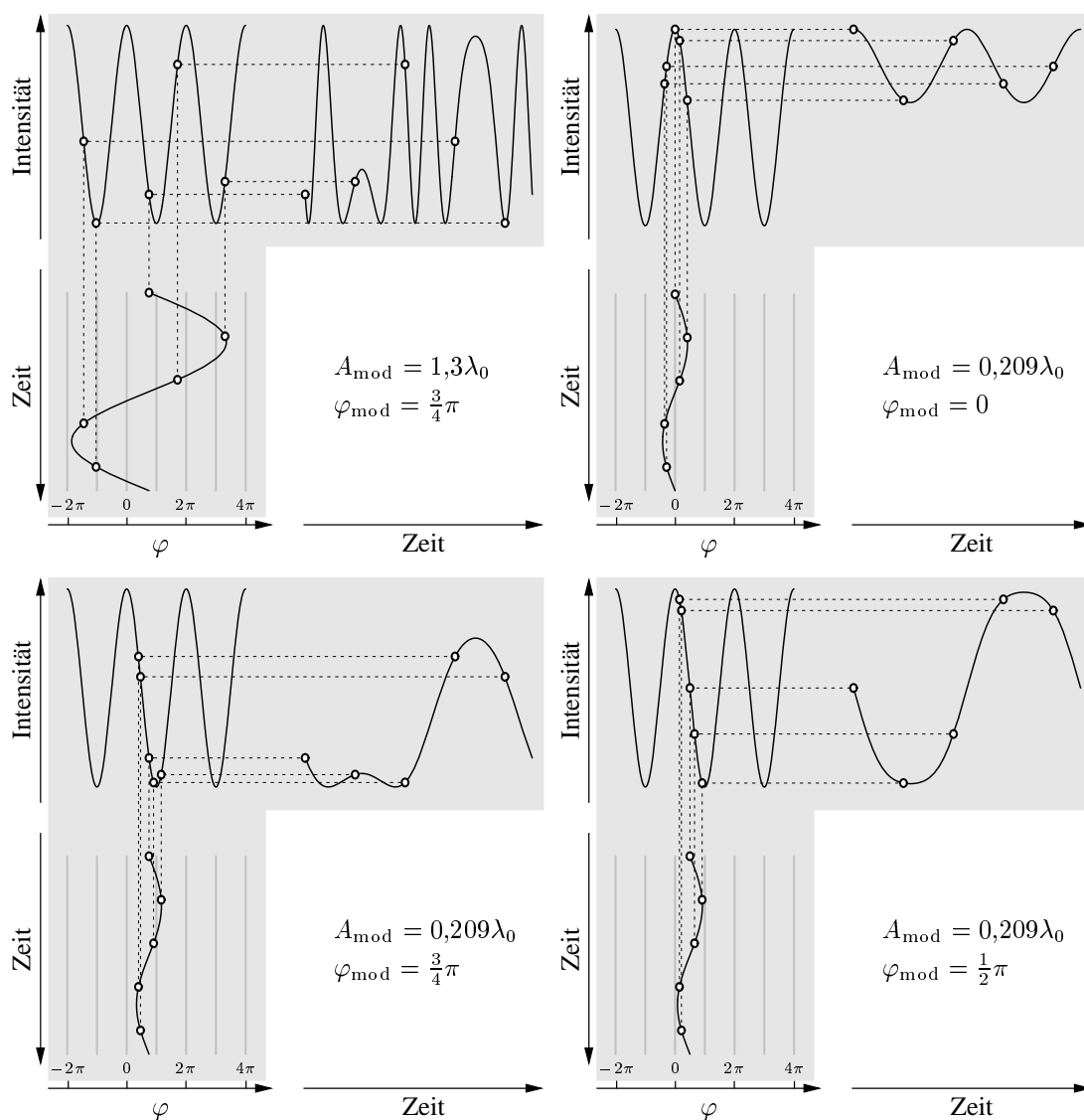


Abbildung 2.7 Entstehung des periodischen Detektorsignals im optischen Kohärenzmikroskop bei Phasenmodulation im Referenzarm. Jeweils unten ist die harmonische Modulation des optischen Weglängenunterschiedes in Form des Argumentes $\varphi = \varphi_{\text{mod}} + 2k_0 A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t)$ der Cosinusfunktion in Gleichung (2.39) dargestellt. Die Modulation wird über die Form des Interferenzstreifenmusters auf das zeitabhängige Detektorsignal übertragen. Abhängig von der Phasenlage φ_{mod} des Arbeitspunktes und der Modulationsamplitude A_{mod} ergeben sich vielfältige Signalformen mit jeweils unterschiedlichen Oberfrequenzanteilen.

von BESSELfunktionen:

$$\begin{aligned}
 I \approx \frac{P_{\text{src}}}{4} & \left(1 + R_s + 2\sqrt{R_s} \left(J_0(2k_0 A_{\text{mod}}) \cos \varphi_{\text{mod}} \right. \right. \\
 & + 2 \sum_{i=1}^{\infty} J_{2i}(2k_0 A_{\text{mod}}) \cos \varphi_{\text{mod}} \cos(2i \omega_{\text{mod}} t) \\
 & \left. \left. - 2 \sum_{i=1}^{\infty} J_{2i-1}(2k_0 A_{\text{mod}}) \sin \varphi_{\text{mod}} \sin((2i-1) \omega_{\text{mod}} t) \right) \right) \quad (2.41)
 \end{aligned}$$

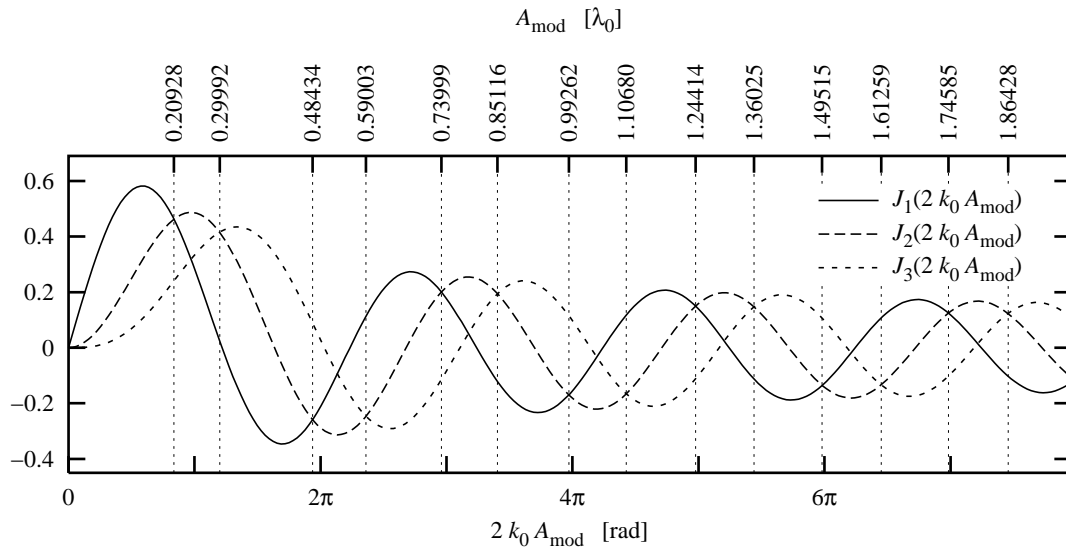


Abbildung 2.8 Verlauf der Besselfunktionen J_1 , J_2 und J_3 und die ersten Elemente der Mengen \mathcal{Q}_1 und \mathcal{Q}_2 , die gemäß Gleichung (2.44) die Lösungen A_{mod} der Gleichungen $J_1(2k_0 A_{\text{mod}}) = J_2(2k_0 A_{\text{mod}})$ und $J_3(2k_0 A_{\text{mod}}) = J_3(2k_0 A_{\text{mod}})$ enthalten.

Gleichung (2.41) enthält eine Darstellung des Leistungsspektrums des periodischen Detektorsignals. Der Betrag der in jeder Oberfrequenz $m \omega_{\text{mod}}/2\pi$ der Modulationsfrequenz $\omega_{\text{mod}}/2\pi$ übertragenen Leistung ist durch die m -te Harmonische

$$\mathcal{H}_m = P_{\text{src}} \sqrt{R_s} J_m(2k_0 A_{\text{mod}}) \begin{cases} |\cos \varphi_{\text{mod}}| & m \text{ gerade} \\ |\sin \varphi_{\text{mod}}| & m \text{ ungerade} \end{cases} \quad (2.42)$$

gegeben. Zwar ist jede Harmonische der Wurzel des Reflexionsvermögens R_s der Probe proportional, allerdings hängt auch sie von der Phasenlage φ_{mod} des Arbeitspunkts und der Modulationsamplitude A_{mod} ab (Abbildung 2.9 oben). Die Phasenlage ist nicht genau bekannt und kann sich während der Bildaufnahme objektbedingt oder durch äußere Einflüsse auf das Interferometer ändern. Allerdings ist bei geeigneter Wahl der Modulationsamplitude die Summe der Quadrate zweier Harmonischer aufeinanderfolgender Ordnungen m und $m + 1$ wegen $\sin^2 x + \cos^2 x = 1$ unabhängig von der Phasenlage (Abbildung 2.9 unten):

$$\mathcal{H}_m^2 + \mathcal{H}_{m+1}^2 = (P_{\text{src}} J_m(2k_0 A_{\text{mod}}))^2 R_s \quad \forall A_{\text{mod}} \in \mathcal{Q}_m \quad (2.43)$$

$$\mathcal{Q}_m = \{A_{\text{mod}} \in \mathbb{R}^+ \mid J_m(2k_0 A_{\text{mod}}) = J_{m+1}(2k_0 A_{\text{mod}})\} \quad (2.44)$$

Die Bedingung $A_{\text{mod}} \in \mathcal{Q}_m$ fordert, daß in den beiden Oberfrequenzen im Maximum jeweils gleich viel Leistung übertragen wird. Aufgrund des Verlaufs der BESSELfunktionen enthält jede Menge \mathcal{Q}_m unendlich viele diskrete Lösungen (Abbildung 2.8). Die meiste Leistung wird bei dem kleinsten Element $A_{\text{mod}} \approx 0,20928\lambda_0$ aus \mathcal{Q}_1 übertragen, weshalb das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Bildintensität

$$I_{\text{OCM}} = \mathcal{H}_1^2 + \mathcal{H}_2^2 \sim R_s \mid A_{\text{mod}} \approx 0,20928\lambda_0 \quad (2.45)$$

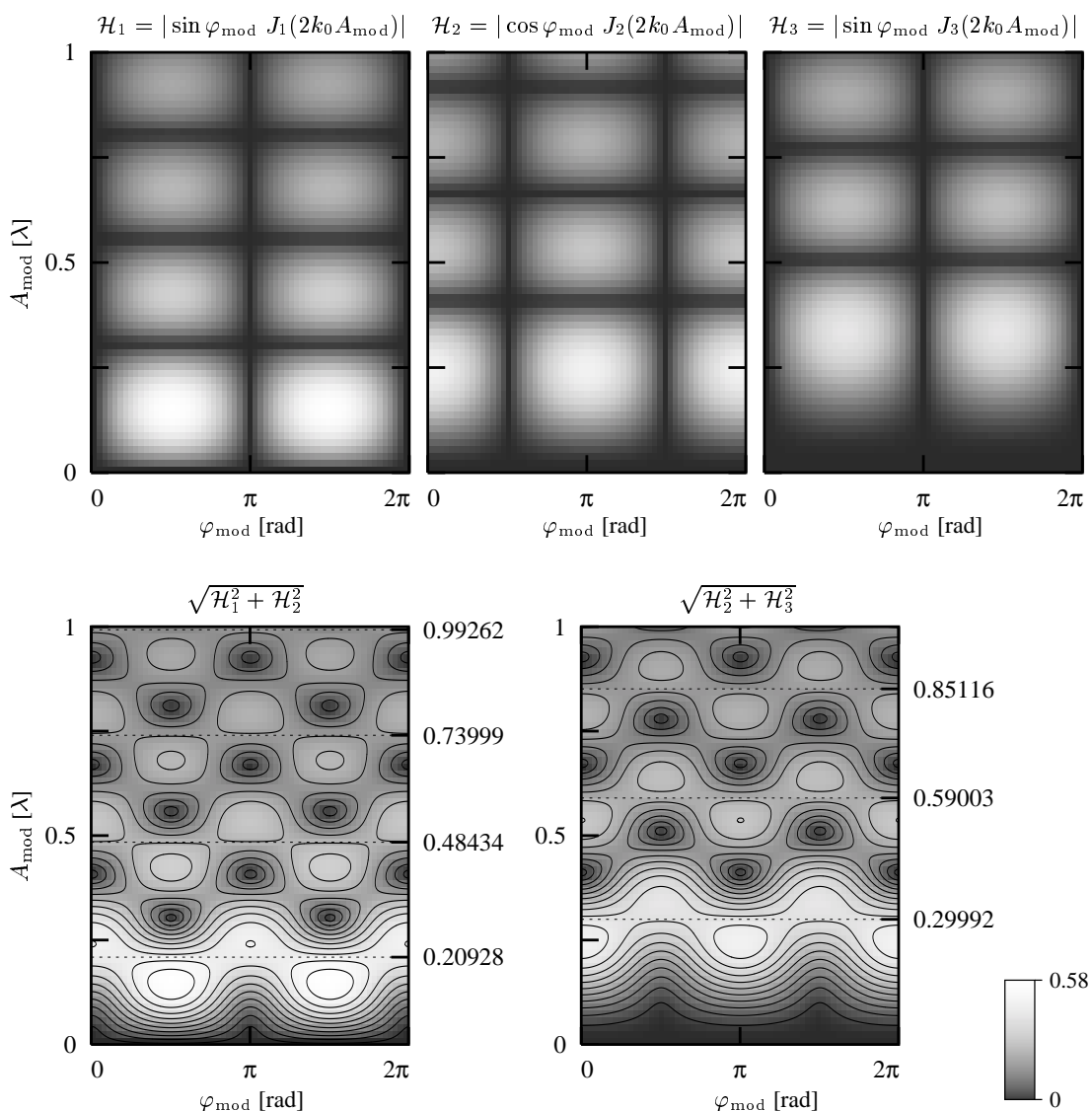


Abbildung 2.9 *Oben:* Abhängigkeit der Harmonischen \mathcal{H}_1 , \mathcal{H}_2 und \mathcal{H}_3 des Detektorsignals (Abbildung 2.7) von der Modulationsamplitude A_{mod} und der Phasenlage φ_{mod} des Arbeitspunktes. *Unten:* Bei diskreten Beträgen der Modulationsamplitude A_{mod} sind $\mathcal{H}_1^2 + \mathcal{H}_2^2$ und $\mathcal{H}_2^2 + \mathcal{H}_3^2$ unabhängig von φ_{mod} .

des optischen Kohärenzmikroskops durch Kombination von \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 erreicht wird. Die Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 treten dann komplementär auf und tragen die Phaseninformation des Objekts (Abbildung 2.10).

2.2.4 Entwicklungsstand existierender Systeme

Die optische Kohärenzmikroskopie wurde im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen untersucht, wobei mit einem Laboraufbau im Bild eine Dynamik von 60 dB

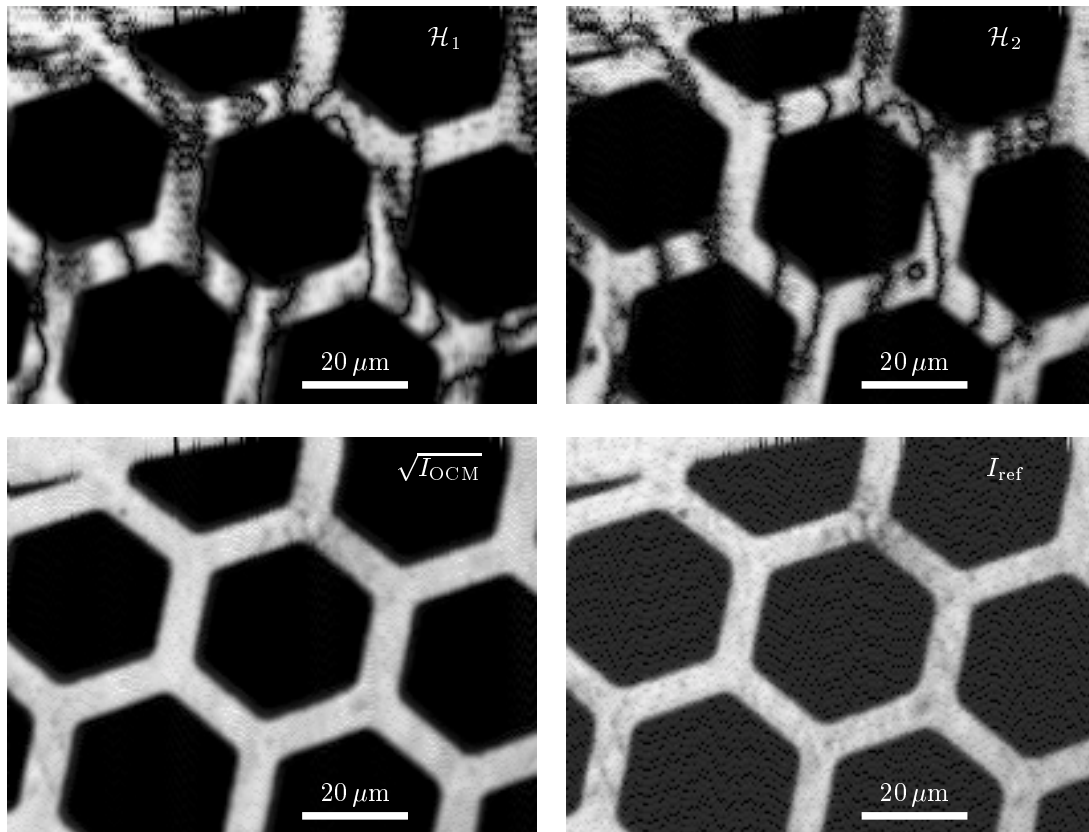


Abbildung 2.10 Probennetz für die Transmissionselektronenmikroskopie. Aus den Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 wird gemäß Gleichung (2.45) das Bild I_{OCM} des optischen Kohärenzmikroskops zusammengesetzt, das dem Bild I_{ref} des Reflexionsmikroskops entspricht. Abhängig von der Objektphase dominiert eine der beiden Harmonischen.

und für Gewebe aus dem Verdauungstrakt Informationstiefen von einigen hundert Mikrometern erreicht wurden (Izatt u. a. 1996). Ein verbesserter Laboraufbau (Hoeling u. a. 2000) zur Untersuchung von Gewebevolumenta von jeweils mehreren $100 \mu\text{m}$ Kantenlänge zielt auf entwicklungsbiologische Anwendungen und zeigt daher keine Tendenz zur Miniaturisierung. Ein Weißlichtinterferometer mit CCD-Detektion (Dubois u. a. 1999) ergibt zwar hohe Bildraten, ist aber weder konfokal noch in ein flexibles Endoskop integrierbar. Parallele optische Kohärenztomographie mittels eines demodulierenden Detektorarrays kombiniert mit einem Ti:Saphir-Laser als Lichtquelle (Bourquin u. a. 2000) erreicht eine entsprechend gute axiale Auflösung, jedoch ist auch dieses Verfahren prinzipiell nicht konfokal.

Ein in Verbindung mit einer konfokalen, endoluminal einsetzbaren Sonde arbeitendes optisches Kohärenzmikroskop existiert bislang nicht. Die in Kapitel 5 vorgestellte Sonde berührt diverse Patente zur Realisierung der Rastereinheit mit elektrostatisch betriebenen Mikrosiegeln (Harris 1990; Dütting u. a. 1998; Dickensheets und Kino 1999a, b, 2000).

Kapitel 3

Labora Aufbau eines optischen Kohärenzmikroskops

Ein optisches Kohärenzmikroskop wurde im Labor aufgebaut, um Einsatzmöglichkeiten der optischen Kohärenzmikroskopie im Bereich der endoluminalen Mikroskopie zu untersuchen und Erfahrung im Hinblick auf eine klinisch einsetzbare Implementierung dieser Technik zu gewinnen.

Als Rastermikroskop wurde keine endoluminal einsetzbare Sonde entwickelt, und die Bildaufnahmedauer liegt im Minutenbereich. Das optische Kohärenzmikroskop kann jedoch durch die in Kapitel 5 beschriebenen Maßnahmen zu einem endoluminal einsetzbaren System nachgerüstet werden. Durch diese zweistufige Vorgehensweise wurden die Grundlagenuntersuchungen nicht durch die technisch anspruchsvollen Aufgaben der Miniaturisierung und Geschwindigkeitssteigerung beeinträchtigt.

3.1 Aufbau und Charakterisierung der Komponenten

In diesem Abschnitt wird das im Labor als Vorstufe zu einem endoluminal einsetzbaren System implementierte optische Kohärenzmikroskop (Abbildungen 3.1 und 3.2) anhand seiner Komponenten beschrieben. Zugunsten einer geschlossenen Darstellung werden diese gleichzeitig charakterisiert.

3.1.1 Strahlteiler, Detektor und Lichtquelle

Das MICHELSON-Interferometer ist in Form eines 3 dB-Strahlteilers aus Monomodendichtwellenleitern für das O-Band (Spektralbereich von 1250 nm bis 1350 nm) realisiert. Die Cutoff-Wellenlänge, unterhalb derer sich auch höhere Moden ausbreiten können, liegt mit 1250 nm unterhalb des Spektralbereichs der Lichtquelle. Die numerische Apertur des Lichtwellenleiters beträgt 0,13, der Durchmesser der Grundmode

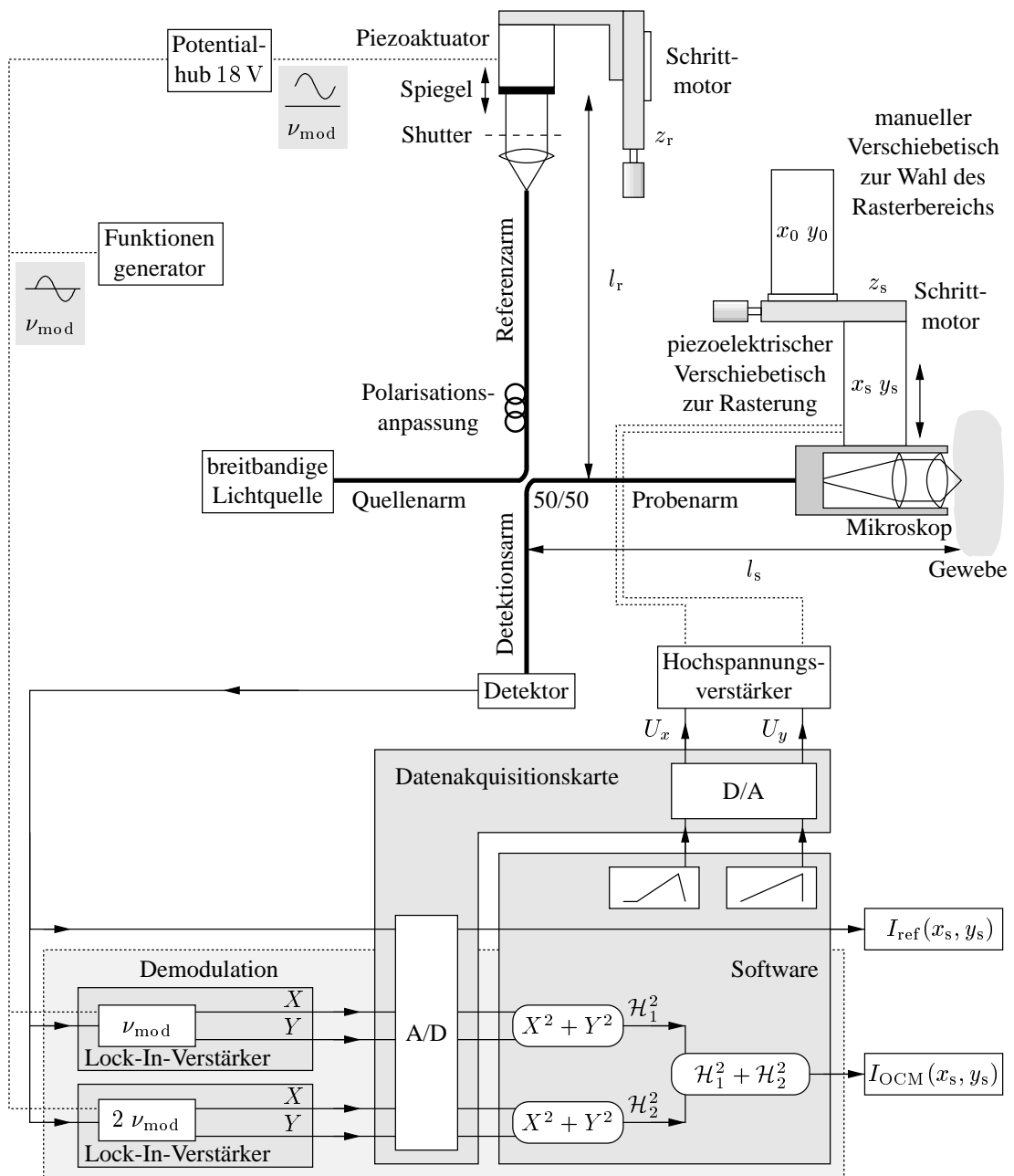


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des im Labor implementierten optischen Kohärenzmikroskops, das durch Blockieren des Shutters als Reflexionsmikroskop betrieben werden kann.

9,3 μm . Die Enden der Lichtwellenleiter des Strahlteilers sind in Quellen-, Proben- und Detektionsarm jeweils mit einem FC/PC-Stecker¹ konfektioniert, im Referenzarm mit einem FC/APC-Stecker. Denn Reflexionen an Steckern können in Quellen- und Detektionsarm nicht wesentlich zu einem Untergrund bei der Detektion beitragen, und die

¹FC-Steckverbinder dienen dem zentrierten, verlustarmen und mehrfach lösbaren Verbinden von Lichtwellenleitern. Beim FC/PC-Stecker sind die Endflächen senkrecht zur optischen Achse poliert, beim FC/APC-Stecker dagegen um 8° geneigt, damit an ihnen reflektiertes Licht ausgekoppelt wird.

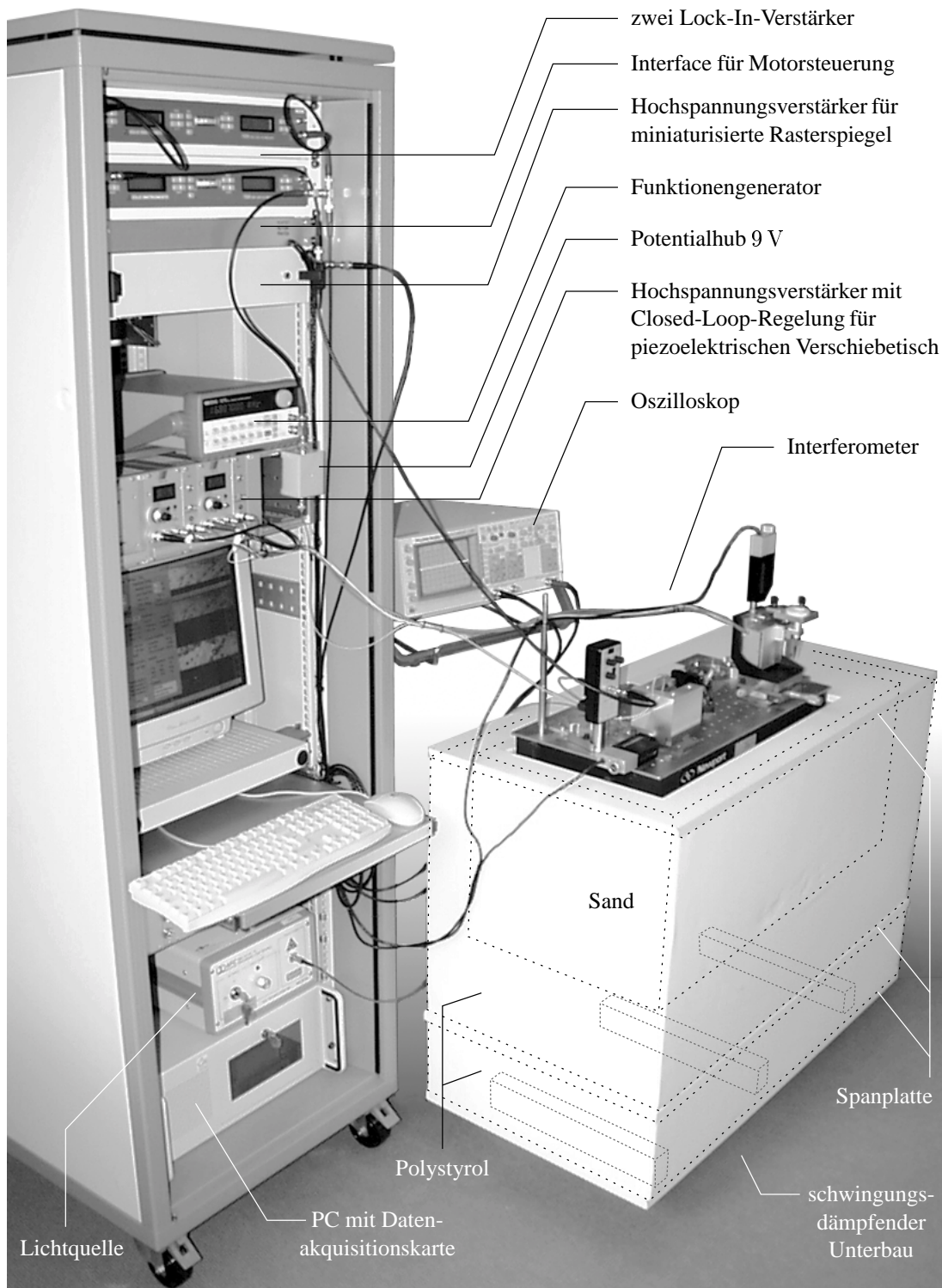


Abbildung 3.2 Die Komponenten des im Labor implementierten optischen Kohärenzmikroskops sind in einem 19"-Schrank und auf einer optischen Tischplatte untergebracht, welche auf einer schwingungsdämpfenden Konstruktion ruht. Diese besteht aus einer optionalen Lage Schwimmflügel, einer 20 cm starken Polystyrolplatte, und einem 50 cm hohen, ausgehöhlten und mit Sand gefülltem Polystyrolkubus. Zwischen Sand und optischer Tischplatte befinden sich mehrere Lagen Luftpolsterfolie. Auf der optischen Tischplatte (Abbildung B.7) befindet sich das Interferometer mit konfokalem Mikroskop, Verzögerungsstrecke und Detektor. Alle weiteren Komponenten sind im Schrank untergebracht.

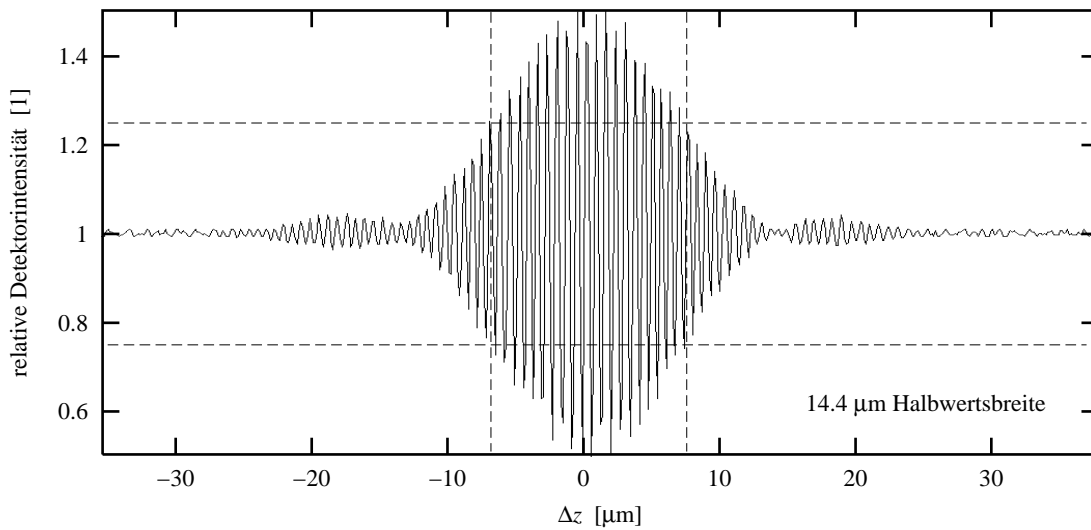


Abbildung 3.3 Autokorrelationsfunktion der verwendeten Lichtquelle AFC BBS 1310B-TS. Zur ihrer Messung wird ein Spiegel als Probe fokussiert und dann die Referenzarmlänge linear erhöht, wobei die abgegliche Position $\Delta z = 0$ passiert wird.

Pupille im konfokalen Mikroskop soll symmetrisch ausgeleuchtet werden. Der weder durch Probe noch Referenzarmspiegel bedingte Untergrund entsteht fast vollständig am Stecker des Probenarms und beträgt 1% der Lichtquellenleistung (Anhang B.1.1).

Der Detektor (New Focus 2011) basiert auf einer Photodiode und ist über eine FC/PC-Buchse mit dem Strahlteiler verbunden. Die Grundempfindlichkeit von $0,53\text{V/mW}$ kann durch einen Vorverstärker mit diskreten Verstärkungsfaktoren erhöht werden. Bei der niedrigsten Verstärkung arbeitet der Detektor bis maximal 8mW linear. Der integrierte Bandpaßfilter wird umgangen.

Die verwendete Superlumineszenzdiode (AFC BBS 1310B-TS) koppelt eine Ausgangsleistung von maximal 17mW in einen Monomodendichtwellenleiter ein, wobei stets 6mW eingesetzt wurden. Sie ist über eine FC/PC-Kupplung mit dem Strahlteiler verbunden. Superlumineszenzdiode emittieren als Mischform zwischen LED und Laserdiode unpolarisiertes oder nur teilweise polarisiertes Licht. Der Polarisationsgrad wurde gemessen zu $5,1^\circ \pm 0,8^\circ$ (Anhang B.1.3). Die vom Hersteller vermessene spektrale Leistungsdichte (Abbildung 4.1) ergibt sich vermutlich aus Überlagerung mehrerer Superlumineszenzdiode und hat bei einer Zentralwellenlänge $\lambda_0 = 1310\text{nm}$ die Halbwertsbreite $\Delta\lambda = 68\text{nm}$. Daraus berechnet sich gemäß Gleichung (2.36) die Kohärenzlänge zu $l_c = 11,1\mu\text{m}$. Eine Kontrollmessung mit einem Spektrometer (Anritsu MS9702A) ergab eine Halbwertsbreite von $\Delta\lambda = 60\text{nm}$, was einer Kohärenzlänge von $l_c = 12,6\mu\text{m}$ entspricht. Die Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle (Abbildung 3.3) führt auf eine etwas höhere Kohärenzlänge von $l_c = 14,4\mu\text{m}$. Ihre Einhüllende zeigt Nebenmaxima, da die spektrale Leistungsdichte (Abbildung 4.1) nicht ideal GAUSSförmig ist. Die Form der spektralen Leistungsdichte kann vielmehr vereinfacht als Mischform aus einer Rechteckfunktion und einer GAUSSfunktion angesehen werden, deren FOURIERtransformierte jeweils durch eine sinc-Funktion

und eine GAUSSfunktion gegeben sind. Die Charakteristik der sinc-Funktion, welche unendlich viele Nebenmaxima aufweist, ist demnach schwach in Form der beiden Nebenmaxima in der Einhüllenden der Autokorrelationsfunktion enthalten.

Der Kontrast des Interferenzstreifenmusters beträgt $\frac{1}{2}$, was damit übereinstimmt, daß unter den Meßbedingungen die Leistungen aus Proben- und Referenzarm im Verhältnis 3 : 1 zueinander stehen (Anhang B.1.1).

3.1.2 Lichtwellenleiter und Polarisationsanpassung

Für einen maximalen Kontrast der Autokorrelationsfunktion müssen die aus Proben- und Referenzarm in den Detektionsarm eingekoppelten Lichtanteile gleich polarisiert sein. Daher behandelt dieser Abschnitt die Grundlagen der Beeinflussung der Polarisation durch Lichtwellenleiter und die daraus resultierende Polarisationsanpassung.

Polarisationszustand, Polarisationsrichtung und Verzögerer

Der Polarisationszustand charakterisiert die Beträge und die relative Phasenlage von zwei zueinander orthogonalen Polarisationsrichtungen einer Lichtwelle. Spezialfälle sind lineare und zirkulare Polarisationszustände. Die Polarisationsrichtung ist die Vorzugsrichtung, die bei linearer oder elliptischer Polarisation durch die Richtung des größten Feldstärkebetrags gegeben ist.

Ein linearer Verzögerer (Bludau 1998b) ist ein doppelbrechendes Element mit zwei senkrecht zueinander und senkrecht zur Lichtausbreitungsrichtung orientierten Hauptachsen des Brechungsindex. Eine eintretende Lichtwelle wird in zwei Komponenten zerlegt, die jeweils in Richtung einer Hauptachse linear polarisiert sind. Beide Komponenten haben innerhalb des Verzögerers unterschiedliche Phasengeschwindigkeiten. Entsprechend spricht man von einer schnellen und einer langsamen Achse. Lineare Verzögerer ändern folglich den Polarisationszustand.

Ein zirkularer Verzögerer (Bludau 1998b) zerlegt eine eintretende Lichtwelle in zwei zirkulare Polarisationszustände mit entgegengesetzter Drehrichtung. Diese haben innerhalb des Verzögerers unterschiedliche Drehgeschwindigkeiten. Zirkulare Verzögerer bewirken eine Drehung der Polarisationsrichtung.

Polarisation im Monomodenlichtwellenleiter

In einem Lichtwellenleiter bewegen sich die beiden orthogonalen Vektormoden der Grundmode mit gleicher Phasengeschwindigkeit und somit unter Erhaltung des Polarisationszustandes, solange der Kern optisch isotrop und Querschnitte durch die Grenzfläche zwischen Kern und Mantel stets kreisförmig und konzentrisch sind (Bludau 1998c). In der Realität liegen diese Bedingungen aufgrund von äußeren mechanischen Spannungen, thermischen Einflüssen und herstellungsbedingten Unregelmäßigkeiten

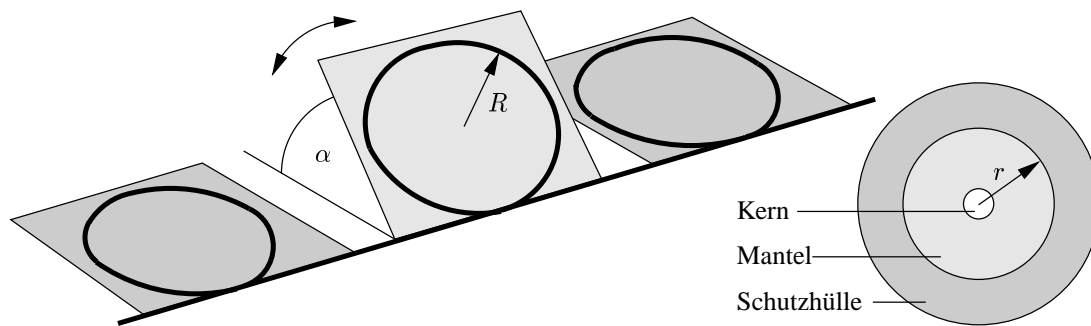


Abbildung 3.4 Änderung des Polarisationszustandes in einem Lichtwellenleiter durch Ausnutzen der in einer Lichtwellenleiterschleife induzierten Doppelbrechung. Die beiden äußeren Schleifen bleiben fixiert, um die mittlere Schleife kontrolliert relativ zu diesen um den Winkel α verdrehen zu können. Die Länge l der mittleren Schleife berechnet sich aus deren Radius R und der Zahl N der Wicklungen. Mit dem Mantelradius r des Lichtwellenleiters und der materialabhängigen photoelastischen Konstante a berechnet sich dann die Verzögerung δ (LeFevre 1980) zwischen der schnellen und der langsamen Achse zu $\delta = a l (r/R)^2 = 2\pi a N r^2/R$.

der Kerngeometrie (LeFevre 1980) nicht vor, so daß der Polarisationszustand am Ende eines Lichtwellenleiters praktisch nicht vorhersagbar ist. Die Wirkung des Lichtwellenleiters kann als Hintereinanderschaltung eines linearen und eines zirkularen Verzögerers verstanden werden. Er verändert also Polarisationszustand und -richtung.

Das vom Quellenarm zum Strahlteiler gelangende Licht ist somit wegen der Eigenschaften der Lichtquelle ein Ensemble von Wellenzügen mit schwach ausgeprägter Polarisationsrichtung. Der Polarisationszustand eines einzelnen Wellenzuges ist undefiniert, jedoch unmittelbar nach seiner Verteilung auf Proben- und Referenzarm in diesen gleich. Aufgrund der Reflexion an den Enden beider Arme passiert jeder Wellenzug den entsprechenden Lichtwellenleiter zweimal in jeweils entgegengesetzter Richtung. Drehungen der Polarisationsrichtung auf dem Hinweg werden auf dem Rückweg wieder rückgängig gemacht. Die Änderung des Polarisationszustandes dagegen wird nicht aufgehoben, weil sich der zwischen den Vektormoden induzierte Phasenunterschied verdoppelt. Wirkt der Lichtwellenleiter bei einfachem Passieren wie eine λ/b -Platte mit $b \in \mathbb{R}$, so ist sein Effekt in Hin- und Rückrichtung der einer $2\lambda/b$ -Platte.

Folglich muß in den Proben- oder den Referenzarm ein Gerät zur Einstellung des Polarisationszustandes integriert werden. Als solches dient eine Lichtwellenleiterschleife (Abbildung 3.4), deren Ebene relativ zu den verbleibenden Teilen des Lichtwellenleiters verdreht werden kann (LeFevre 1980). Infolge der durch die Biegung der Faser induzierten Spannungsdoppelbrechung liegt die schnelle Achse stets in der Ebene der Schleife und die langsame Achse senkrecht dazu. Die erreichte Verzögerung zwischen den Achsen hängt von der Geometrie der Schleife ab. Das Verdrehen der Schleife wirkt wie die Rotation einer Verzögerungsplatte. Eine entsprechende Vorrichtung von Fiber Control Industries ist im Referenzarm integriert (Abbildung B.7), und durch eine Verdrehung um weniger als 90° kann der Polarisationszustand dem aus dem Probenarm angepaßt werden.

3.1.3 Demodulation, Datenaufnahme und Bildberechnung

Das Ausgangssignal des Detektors in Form einer elektrischen Spannung wird zur Aufnahme des Reflexionsmikroskopiebildes $I_{\text{ref}} \sim R_s$ direkt einer Datenakquisitionskarte (National Instruments PCI-MIO-16E-4) zugeführt. Das Signal wird ferner zur Demodulation auf zwei digitale Lock-In-Verstärker (EG&G Instruments 7220) verteilt. Beide Lock-In-Verstärker werden mit dem die Referenzarmmodulation ansteuernden Signal synchronisiert und sind identisch konfiguriert, außer, daß ein Lock-In-Verstärker auf der zweifachen Grundfrequenz demoduliert. Es resultieren die erste Harmonische \mathcal{H}_1 und die zweite Harmonische \mathcal{H}_2 des Detektorsignals, die zur Ermöglichung einer ausreichenden Bandbreite jeden Lock-In-Verstärker unter Umgehung des internen Mikroprozessors in Form der X- und Y-Komponenten verlassen und von der Datenakquisitionskarte als die vier Kanäle \mathcal{H}_{1X} , \mathcal{H}_{1Y} , \mathcal{H}_{2X} und \mathcal{H}_{2Y} eingelesen werden. Dabei ist $\mathcal{H}_1^2 = \mathcal{H}_{1X}^2 + \mathcal{H}_{1Y}^2$ und $\mathcal{H}_2^2 = \mathcal{H}_{2X}^2 + \mathcal{H}_{2Y}^2$, woraus nach Gleichung (2.45) $I_{\text{OCM}} \sim R_s$ berechnet wird. Passend zur größtmöglichen Pixelrate von 2 ms^{-1} (Abschnitt 3.1.4) beträgt die Zeitkonstante der Lock-In-Verstärker $0,64 \text{ ms}$, was bei $\nu_{\text{mod}} = 16,887 \text{ kHz}$ (Abschnitt 3.1.5) knapp 11 Modulationszyklen entspricht.

Die Eingangsspannungsbereiche der Datenakquisitionskarte bleiben stets fest, nämlich bei $[0 \text{ V}, 10 \text{ V}]$ für das Signal des Detektors und bei $[-5 \text{ V}, 5 \text{ V}]$ für die vier Komponenten der Harmonischen. Die Pegelanpassung erfolgt über den Verstärker des Detektors und die Eingangsempfindlichkeiten der Lock-In-Verstärker.

Üblicherweise werden die Bilder I_{ref} und I_{OCM} unmittelbar hintereinander aufgenommen, wobei die Aufnahme von I_{ref} bei blockiertem Referenzarm erfolgt. Die Spannungswerte der fünf Kanäle werden zusammen mit allen Parametern des optischen Kohärenzmikroskops und der Möglichkeit eines Kommentares in einer Datei abgelegt.

3.1.4 Konfokales Mikroskop mit Rasterverschiebetisch

Im Probenarm ist an den Strahlteiler ein miniaturisiertes konfokales Mikroskop angeschlossen, welches über keine interne Rastereinheit verfügt und stattdessen über einen piezoelektrisch betriebenen Verschiebetisch relativ zu einem unbewegten Probenhalter (Abbildungen 3.5 und B.7) lateral-lateral gerastert wird.

Piezoelektrisch betriebener Rasterverschiebetisch

Die Rasterung erfolgt über einen zweiachsigen, piezoelektrischen Linearverschiebetisch (Piezosystem Jena, PXY 200 D12) mit Positionsrückmeldungsregelung, der in Verbindung mit den zugehörigen Hochspannungsverstärkern einen Hub von $150 \mu\text{m}$ in jeder Richtung liefert. Die langsame Rasterrichtung y_s wird mit einer Sägezahnspannung U_y angesteuert. Die Steuerspannung U_x der schnellen Rasterrichtung x_s besteht aus einer ansteigenden Rampe gefolgt von einer schnell abfallenden Rampe und einer Ruhepause, um Schwingungen des Regelkreises zu vermeiden (Abbildung 3.1). Die

Aktualisierung der Steuerspannung U_x ist mit der Abtastung der fünf Akquisitionskanäle synchronisiert. Die Rastergeschwindigkeit \dot{x}_s ist größer als $50 \mu\text{m/s}$, um eine Stufenbewegung zu vermeiden (Abbildung B.1), und kleiner als $1000 \mu\text{m/s}$, um nicht durch die mechanische Trägheit beschränkt zu sein. Unter Einhaltung des NYQUIST-Theorems wird üblicherweise mit einer Ortsauflösung von $0,5 \mu\text{m}$ gerastert. Zusammen mit der gewählten Pixelrate von 1 kHz führt dies auf eine Rastergeschwindigkeit von $\dot{x}_s = 1 \text{ mm/s}$ und eine Bildaufnahmedauer von 90 s .

Der Rasterverschiebetisch ist an einer dreiachsigen Positioniereinrichtung befestigt, die aus drei Verschiebetischen (Newport M-URM 8.25) besteht, die jeweils einen Verfahweg von 25 mm bieten. Der Rasterbereich wird über manuell betätigte Mikrometerschrauben mit einer Auflösung von $1 \mu\text{m}$ und einer Reproduzierbarkeit unter $5 \mu\text{m}$ gewählt. Die axiale Verschiebung erfolgt über einen Schrittmotor (Newport 850F) mit

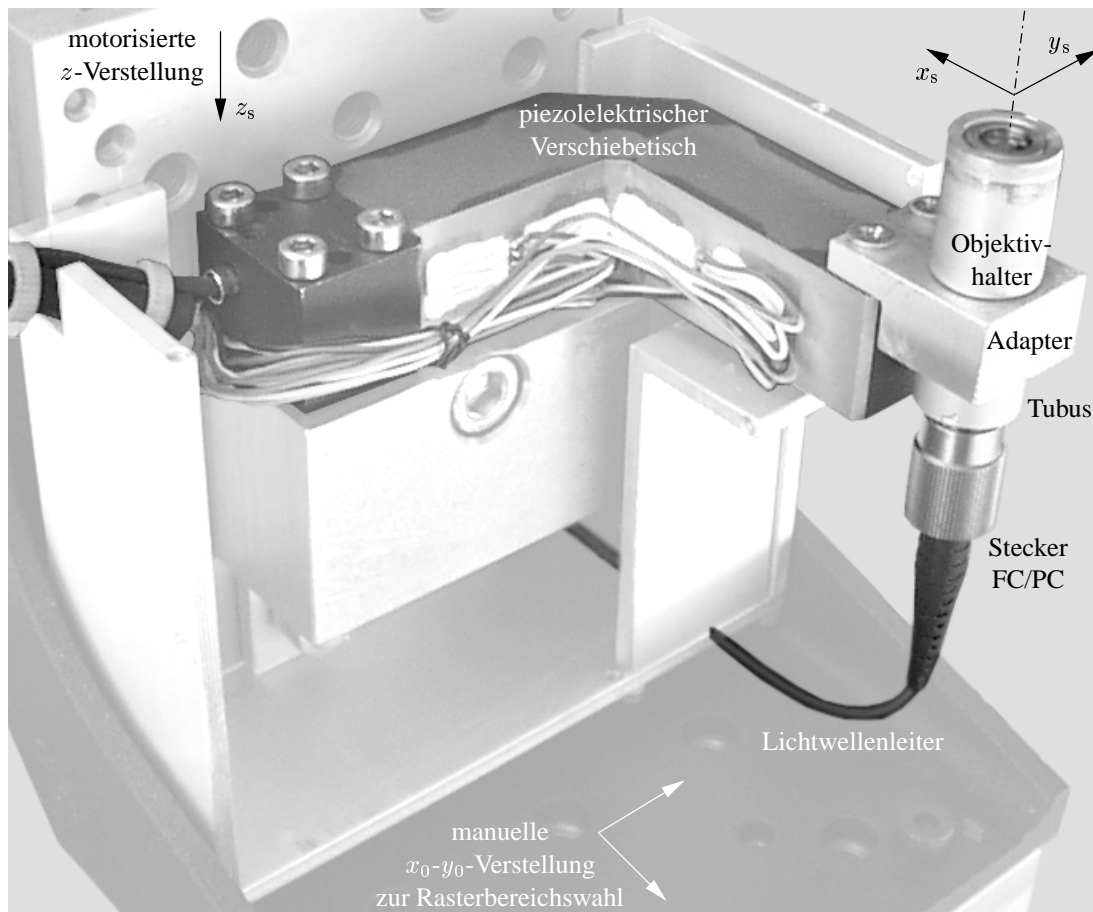


Abbildung 3.5 Piezoelektrisch betriebener Verschiebetisch mit konfokalem Mikroskop und Lage der Koordinatensysteme. Unterhalb des schwarz eloxierten Winkels befinden sich zwei hier nicht sichtbare, gekreuzte Verschiebetische zur Wahl des Rasterbereichs. Der zum konfokalen Mikroskop führende Lichtwellenleiter ist relativ zu dem motorisierten Verschiebetisch fixiert, jedoch wird die Polarisation aufgrund der Länge des freien Lichtwellenleiters relativ zum Hub des Rasterverschiebetischs nicht beeinflusst.

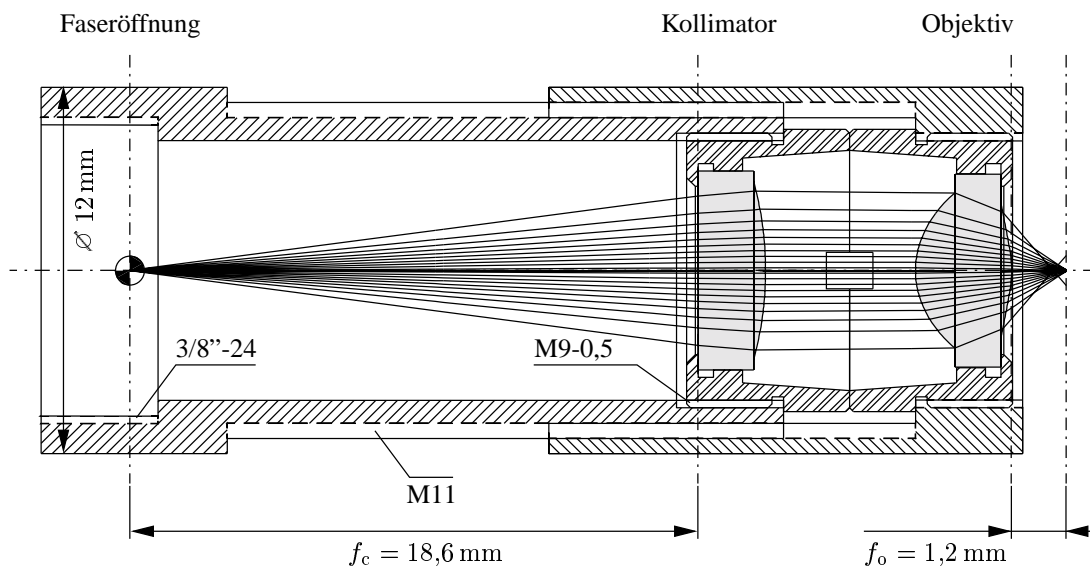


Abbildung 3.6 Strahlengang und Optomechanik des konfokalen Mikroskops für den Laboraufbau. Eine Buchse für einen FC/PC-Stecker wird von links in den Tubus eingeschraubt, so daß das Ende des Lichtwellenleiters an der als Brennpunkt markierten Stelle liegt. Das austretende Licht wird als GAUSSSches Strahlbündel mit der durch numerischen Apertur und Grundmodenhalbwertsbreite des verwendeten Lichtwellenleiters in ZEMAX-SE 7 modelliert.

einer Schrittweite von $0,05 \mu\text{m}$, der eine Positionsrückmeldung über eine Schnittstellenkarte bietet. Eine reproduzierbare Positioniergenauigkeit von etwa $0,5 \mu\text{m}$ wird empirisch erreicht, wenn die Sollposition immer aus derselben Richtung mit Geschwindigkeiten unter $25 \mu\text{m/s}$ angefahren wird. Dies wurde bei positionierkritischen Ansteuerungen generell berücksichtigt.

Der Probenhalter ist oberhalb des Objektivs montiert (Abbildung B.7) und um die zwei lateralen Achsen neigbar, um die Probe senkrecht zur optischen Achse ausrichten zu können. Er nimmt Deckgläser auf, kann aber auch aufgrund von Montagebohrungen flexibel mit anderen Objekten bestückt werden.

Konfokales Mikroskop

Das konfokale Mikroskop (Abbildungen 3.5 und 3.6) muß aufgrund seiner Rasterbewegung relativ zur Probe nicht für bildfeldabhängige Fehler korrigiert sein. Es besteht aus einer FC/PC-Buchse und einer Kollimatorlinse (Geltech 350280), die beide in einen Tubus geschraubt sind. Auf den Tubus wird der Objektivhalter mit der eingeschraubten Objektivlinse (Geltech 350330) der numerischen Apertur $N.A. = 0,68$ geschraubt, so daß die Fassungen der beiden passend antireflexbeschichteten Linsen kontaktieren.

Während der Abstand zwischen Objektiv und Kollimator unkritisch ist, wurde der optimale Abstand f_c zwischen Lichtwellenleiterende und Kollimator experimentell ba-

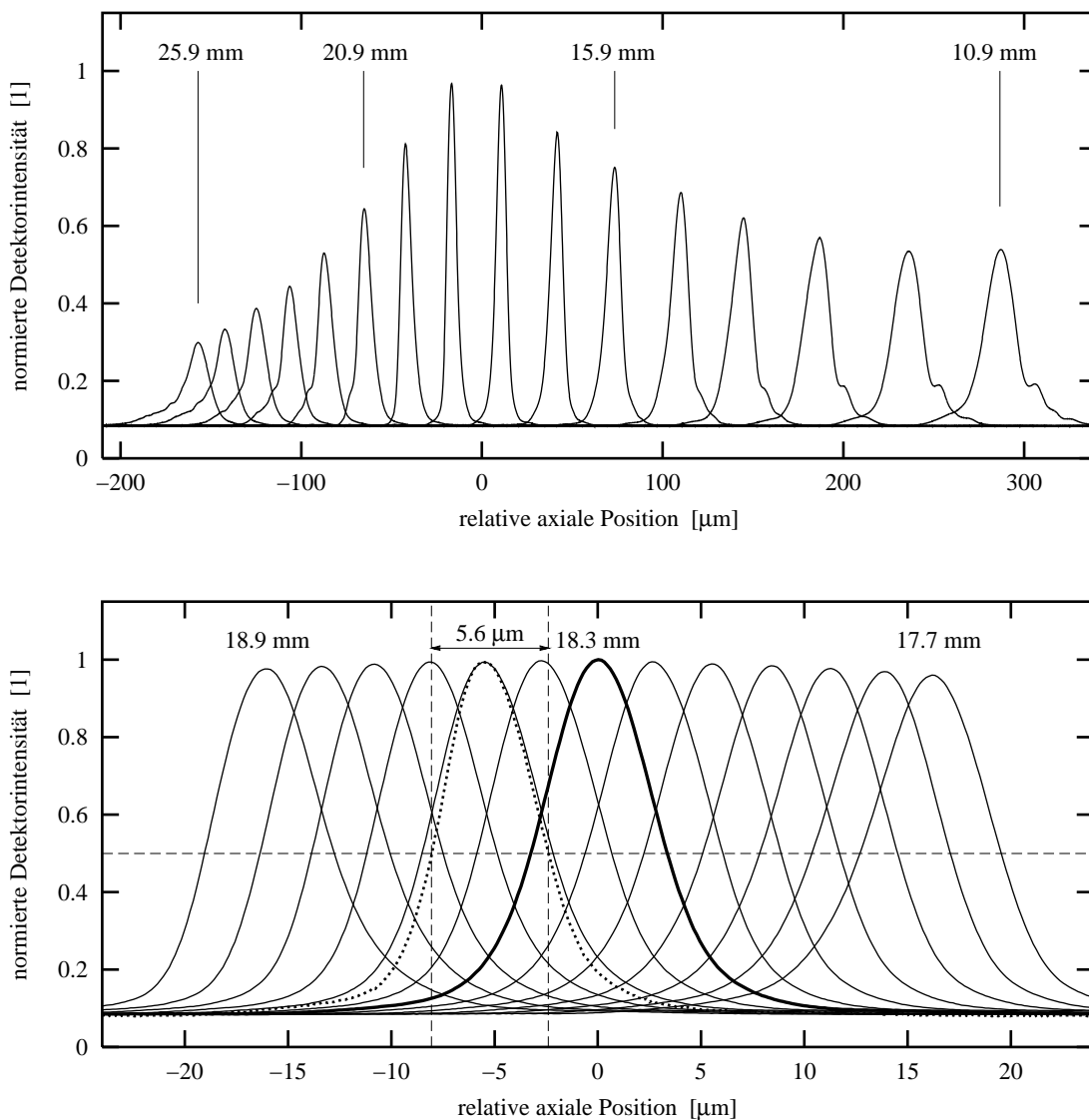


Abbildung 3.7 Oben: Axiale konfokale Punktbildfunktion abhängig vom Abstand f_c zwischen Lichtwellenleiterende und Kollimator, der über den Kurven angegeben ist. Zur Messung wurden die Komponenten auf einer optischen Bank montiert. Unten: Größte Symmetrie der axialen konfokalen Punktbildfunktion ergibt sich für $f_c = 18,3$ mm, und in Übereinstimmung mit dem Ergebnis durch Raytracing (Abbildung 3.6) liegt die minimale Halbwertsbreite im Bereich $18,3 \text{ mm} < f_c < 18,8 \text{ mm}$. Die punktierte Kurve zeigt das Resultat nach Endmontage des miniaturisierten konfokalen Mikroskops. Aufgrund der besseren Zentrierung verringert sich die Halbwertsbreite auf $5,6 \mu\text{m}$.

sierend auf der axialen konfokalen Punktbildfunktion (Abbildung 3.7) ermittelt. Dies war auch deshalb erforderlich, weil zur Vermeidung von Reflexionen und zur Vereinfachung der Konstruktion die Kollimatorlinse ohne das Fenster verwendet wird, für welches sie vom Hersteller ausgelegt wurde. Die axiale konfokale Punktbildfunktion wird bei geschlossenem Shutter durch Verfahren eines Spiegels durch die Bildebene des Objektivs aufgenommen. Das Mikroskop erreicht konfokal eine Tiefenauflösung

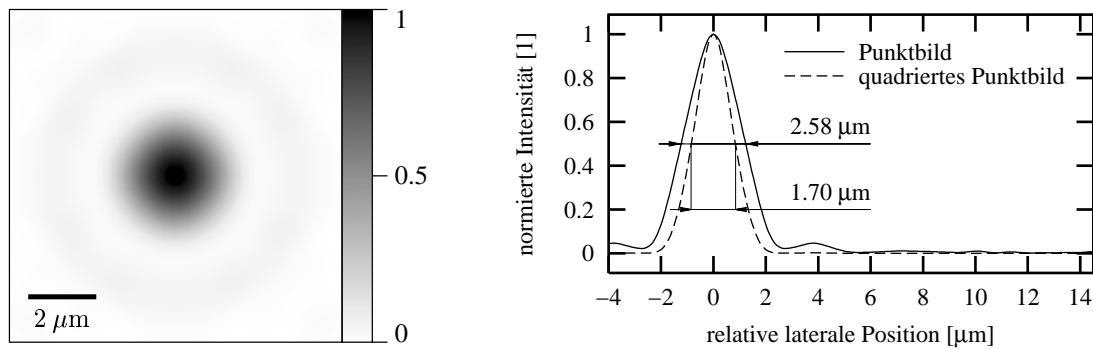


Abbildung 3.8 Links: Laterales Punktbild des konfokalen Mikroskops aus Abbildung 3.6 gemäß Raytracing. Rechts: Schnitt durch das Zentrum des lateralen Punktbildes und seinem Quadrat. Letzteres entspricht theoretisch dem konfokalen Punktbild und liefert eine Halbwertsbreite von $1,70 \mu\text{m}$ gegenüber $2,58 \mu\text{m}$ bei nichtkonfokaler Abbildung.

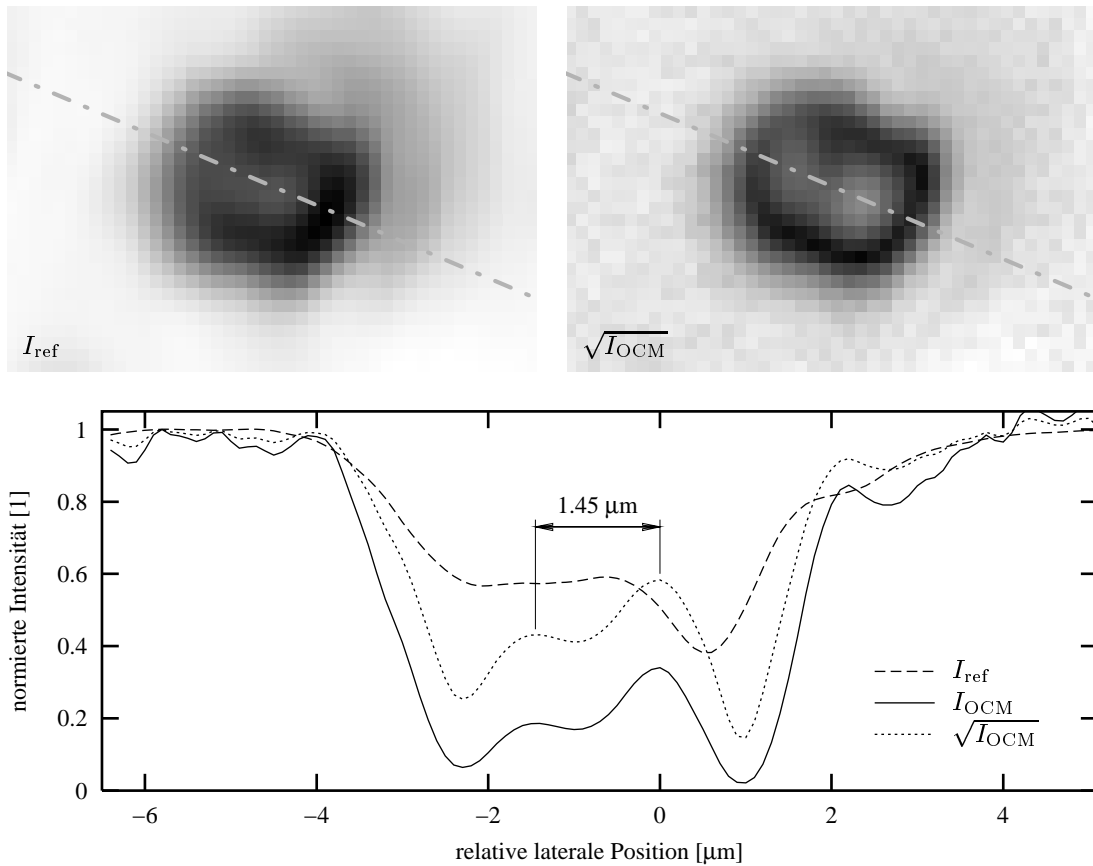
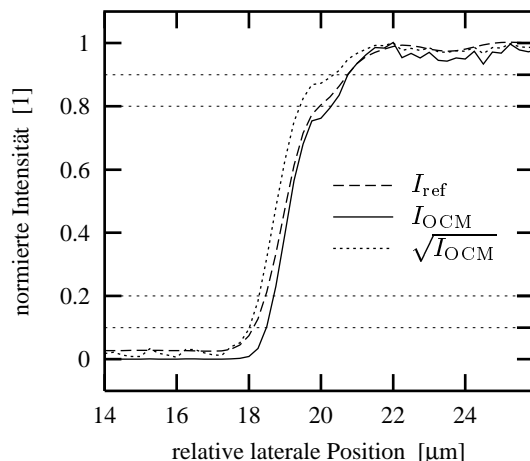


Abbildung 3.9 Abschätzung der lateralen Auflösung des konfokalen Mikroskops aus Bild-daten. Oben: Detail eines reflektierenden Streifens eines RONCHI-Gitters in Reflexions- und Kohärenzmikroskopie. Die beiden Reflexionen im Zentrum sind bei der Kohärenzmikroskopie gerade noch auflösbar, während sie bei der Reflexionsmikroskopie als länggezogener Fleck erscheinen. Unten: Schnitt durch die Bilder entlang der eingezeichneten Linie. Die Kohärenzmikroskopie profitiert von der größeren Kantensteilheit, so daß von einem lateralen Auflösungsvermögen von $1,5 \mu\text{m}$ ausgegangen werden kann.

Kante senkrecht zu x_s (schnelle Rasterrichtung)

	Kantenauflösung			
	20% → 80%		10% → 90%	
	[μm]	[1]	[μm]	[1]
I_{ref}	1,50	1	2,62	1
I_{OCM}	1,59	1,06	2,25	0,86
$\sqrt{I_{\text{OCM}}}$	1,14	0,76	2,33	0,89

Kante senkrecht zu y_s (langsame Rasterrichtung)

	Kantenauflösung			
	20% → 80%		10% → 90%	
	[μm]	[1]	[μm]	[1]
I_{ref}	2,16	1	3,41	1
I_{OCM}	1,92	0,89	3,06	0,90
$\sqrt{I_{\text{OCM}}}$	1,48	0,69	2,53	0,74

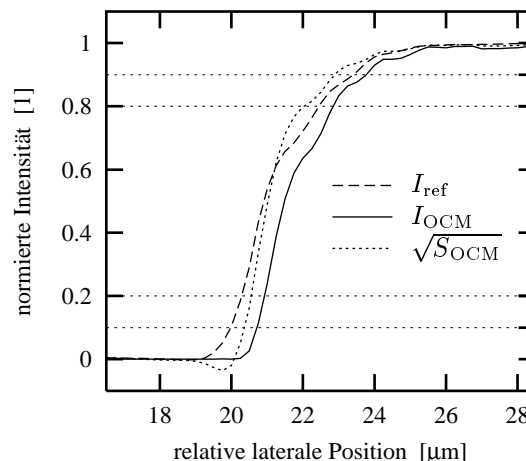


Abbildung 3.10 Kantenauflösung des konfokalen Mikroskops anhand der Kante eines RONCHI-Gitters. Aufgrund der durch die partielle Kohärenz der Lichtquelle bedingten Oszillationen im Kantenprofil sind die angegebenen Auflösungen nicht immer repräsentativ.

von $R_{\text{axial}} = 5,6 \mu\text{m}$, woraus sich nach Gleichung (2.23) eine effektive numerische Apertur von $N.A._{\text{eff}} = 0,42$ berechnet. Dieser Wert ist kleiner als die numerische Apertur der Objektive, da in der Pupille achsferne Strahlen aufgrund der GAUSSschen Intensitätsverteilung unterrepräsentiert sind. Die Einkopplungseffizienz des konfokalen Mikroskops beträgt $\zeta_s = 45\%$ (Anhang B.1.1).

Die laterale Auflösung liegt gemäß Raytracing bei $1,7 \mu\text{m}$ (Abbildung 3.8). Sie wurde experimentell mittels eines Testobjektes dahingehend abgeschätzt, daß beim Betrieb als Reflexionsmikroskop zwei Strukturen von $1,45 \mu\text{m}$ Abstand gerade nicht mehr aufgelöst werden konnten, wohingegen dies beim Betrieb als optisches Kohärenzmikroskop gerade noch gut möglich war (Abbildung 3.9).

Dabei fällt auf, daß I_{OCM} kontrastreicher als I_{ref} ist und die Signalniveaus von $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ eher mit denen von I_{ref} vergleichbar sind. Dies liegt daran, daß das optische Kohärenzmikroskop über einen Dynamikvorteil von 28 dB und eine axiale Auflösung von nur $3,0 \mu\text{m}$ verfügt (Abschnitt 3.2.1). Um Bilddaten des optischen Kohärenzmikroskops für axial in der Größenordnung einer Zelle ausgedehnte Objekte mit denen der Reflexionsmikroskopie vergleichen zu können, werden sie nachfolgend meist als $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ dargestellt. Die resultierende Bevorzugung defokussierter Strukturen kann bei lateral-lateralen Bildern vorteilhaft sein, ist es aber nicht bei der Verarbeitung von Volumendatensätzen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist bei $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ ungünstiger als bei I_{OCM} .

Die Kantenauflösung wurde für I_{ref} , I_{OCM} und $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ jeweils für die Kante eines RONCHI-Gitters gemessen (Abbildung 3.10). Dabei lag die Kante entweder senkrecht zur schnellen oder zur langsamen Rasterrichtung. Jedes Kantenprofil wurde aus 20 benachbarten Bildpunktsäulen aus einem $10\ \mu\text{m}$ breiten Streifen gemittelt. In beiden Fällen ist das Kantenprofil eine Mischform zwischen der kohärenten und inkohärenten Kantenantwort (Born u. a. 1993) und zeigt daher schwach ausgeprägte Oszillationen. Da das lichtwellenleiterbasierte konfokale Mikroskop selbst ein kohärent abbildendes System ist (Abschnitt 2.1.2), ist die erkennbare partielle Kohärenz durch die zeitlichen Kohärenzeigenschaften der Lichtquelle bedingt. Die Lage der Oszillationen stimmen für I_{ref} und I_{OCM} überein, jedoch ist die Auflösung von I_{OCM} um etwa 10% besser als die von I_{ref} . Sie nimmt verständlicherweise für $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ nochmals erkennbar zu.

3.1.5 Verzögerungsstrecke mit Phasenmodulation

Die Verzögerungsstrecke im Referenzarm (Abbildung 3.11) besteht aus einem piezoelektrischen Ringaktuator (Piezomechanik 500/15-8/25 VS 22), der über eine Halterung mit einem motorisierten Verschiebetisch verbunden ist und auf dessen Spitze ein silberbeschichteter Spiegel (New Focus 5153) mit einem Reflexionsvermögen von $R_r = 0,95$ montiert ist. Verschiebetisch und Schrittmotor sind baugleich mit den

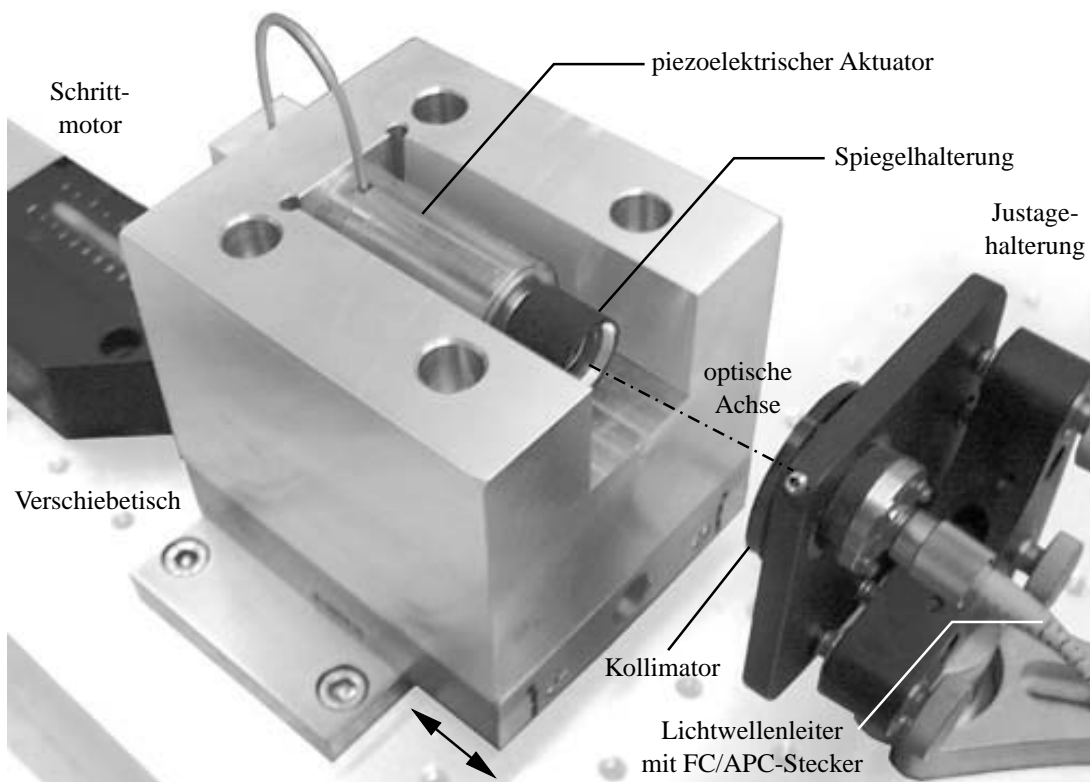


Abbildung 3.11 Verzögerungsstrecke im Referenzarm. Als Shutter (Abbildung 3.1) wird ein opakes, nicht reflektierendes Objekt manuell in zwischen Kollimator und Spiegel eingebracht.

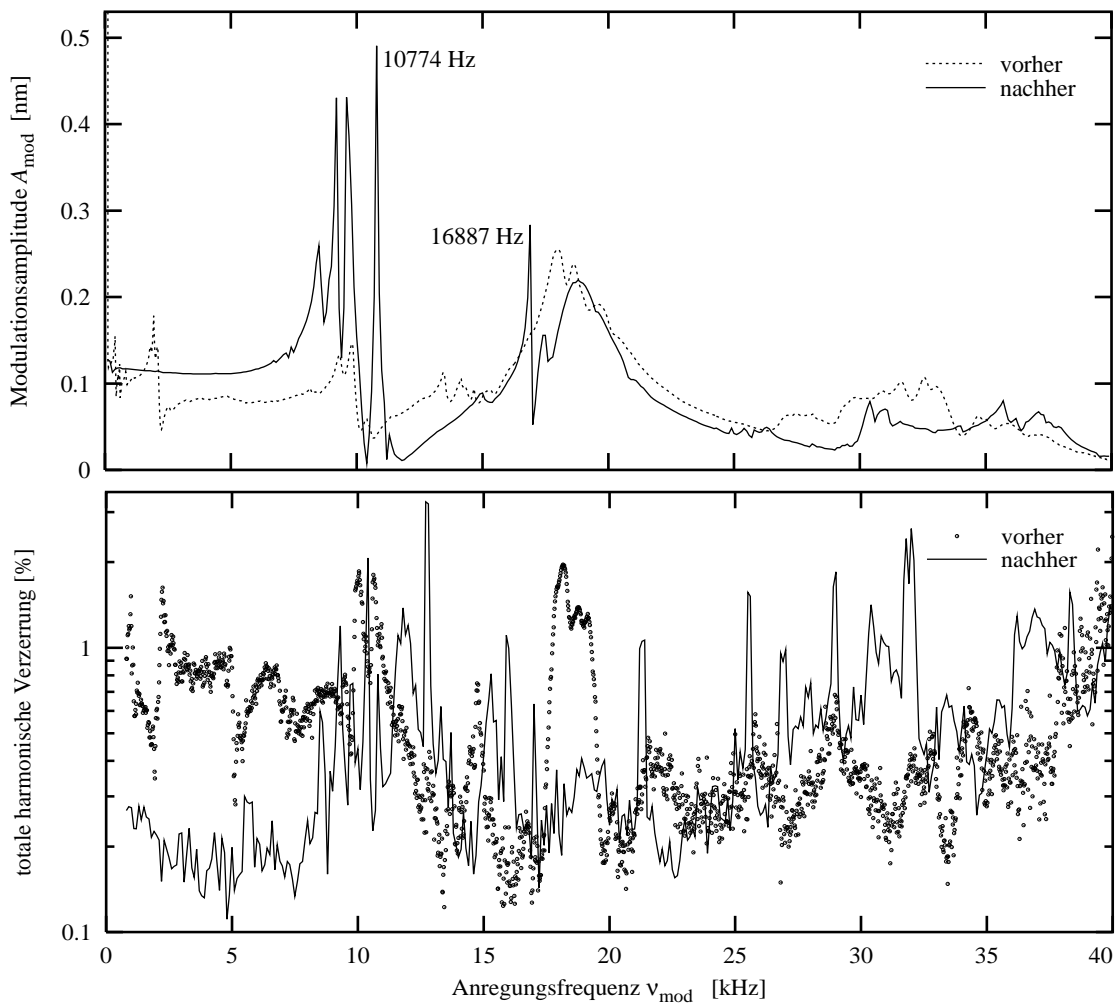


Abbildung 3.12 Frequenzabhängige Amplitude und totale harmonische Verzerrung der piezoelektrischen Phasenmodulation im Referenzarm vor und nach der Stabilisierung der Halterung des Aktuators für $U_{\text{mod}} = 5 \text{ V}$. Während die Anregung bei der ursprünglichen Halterung (Abbildung B.4) zu keinen ausgeprägten Resonanzen der Spiegelbewegung führt, treten mit der stabileren Halterung (Abbildung 3.11) im Bereich um 10 kHz mehrere scharfe Resonanzen auf. Ferner löst sich die Struktur um 18 kHz detaillierter auf, wobei auch hier eine scharfe Resonanz hervortritt. Die totale harmonische Verzerrung liegt im niederfrequenten Bereich und um 18 kHz signifikant niedriger, übersteigt aber bei beiden Halterungen kaum 1%.

entsprechenden Komponenten im Probenarm (Abschnitt 3.1.4). Das vom Strahlteiler kommende Licht wird über einen Kollimator mit FC/APC-Buchse als paralleles Strahlenbündel des Durchmessers 3 mm auf den Spiegel gelenkt und wieder in den Lichtwellenleiter zurückgeführt. Die optische Achse des Kollimators ist über eine Justagevorrichtung senkrecht zur Spiegeloberfläche ausrichtbar. Die Einkopplungseffizienz beträgt im Referenzarm $\zeta_r = 15\%$ (Anhang B.1.1) und ist damit geringer als die des Probenarms, was an der Qualität des Kollimators und an beugungsbedingten Verlusten auf dem freien Lichtweg liegen kann.

Über die Motorposition erfolgt der Abgleich der Referenzarmlänge. Der Aktuator erzeugt die Phasenmodulation der Amplitude $A_{\text{mod}} = 274 \text{ nm}$ gemäß Gleichung (2.45). Er wird dazu mit Batterien mit 18 V vorgespannt und durch einen von der Software gesteuerten Funktionsgenerator (Hewlett Packard 33120A) mit einer harmonischen Spannung der Frequenz $\nu_{\text{mod}} = 16,887 \text{ kHz}$ und der Amplitude $U_{\text{mod}} = (5,1 \pm 0,2) \text{ V}$ resonant betrieben. Die Schwankungen der erforderlichen Spannungsamplitude sind primär temperaturbedingt, weshalb U_{mod} bei Inbetriebnahme oder Änderungen der Umgebung angepaßt werden muß (Abschnitt 3.1.6).

Mit einer ursprünglich verwendeten Halterung (Abbildung B.4) lag die Schwankungsbreite von U_{mod} zwischen 4,5 V und 6,1 V bei $\nu_{\text{mod}} = 18 \text{ kHz}$. Amplitude und totale harmonische Verzerrung der Spiegelbewegung wurden vor und nach dem Einbau der stabileren Halterung frequenzabhängig vermessen (Abbildung 3.12). Die dazu notwendige absolute Messung der Modulationsamplitude wurde mit dem miniaturisierten konfokalen Mikroskop unter Ausnutzung dessen axialer Punktbildfunktion durchgeführt (Anhang B.1.4). Die stabilere Halterung verbessert eindeutig die Güte und wahrscheinlich die Zeitstabilität der Resonanzen, wobei die totale harmonische Verzerrung im Mittel unverändert gering bleibt.

3.1.6 Algorithmen für den praxisnahen Einsatz

Native Gewebeproben sind keine zeitlich stabilen Objekte und verlieren aufgrund autolytischer² und anderer zersetzender Prozesse bereits ein bis zwei Stunden nach der tierexperimentellen Entnahme die *in vivo* vorhandene Struktur. Von wesentlicher Bedeutung ist daher eine Software, die ein effizientes Mikroskopieren ermöglicht. Eine solche Software (Anhang B.1.5) wurde in der Sprache G unter der Umgebung National Instruments LabVIEW 5.1 entwickelt und faßt Geräteinitialisierung, Instrumentensteuerung, Datenakquisition, Bildanzeige, Bildexport sowie eine standardisierte elektronische Dokumentation der Meßdaten einschließlich aller Parameter unter einer graphischen Benutzeroberfläche zusammen. Nachfolgend wird nur auf nicht naheliegende Algorithmen eingegangen, die spezifisch für ein optisches Kohärenzmikroskop sind.

Initialisierung, Autofokus und Bildaufnahmemodi

Die Initialisierung erfolgt sequentiell durch Einstellung Leistung der Lichtquelle³, optionaler Justage von Kollimator und Probenhalter, Bestimmung des axialen Suchintervalls für die Autofokusfunktion, Fokussierung, Bestimmung des axialen Suchintervalls für den automatisierten Referenzarmabgleich, Abgleich der Referenzarmlänge und Einstellung der Modulationsamplitude.

Der Autofokusalgorithmus (Abbildung B.6 unten) sucht, idealerweise bei blockiertem

²gr. *autós* selbst; gr. *lysein* lösen. Eiweißauflösung durch freigesetzte Enzyme (Pschyrembel 1982a).

³Die Leistung der Lichtquelle kann direkt gemessen oder ohne Abkopplung der Lichtquelle über eine Messung des Untergrundes P_{bias} (Anhang B.1.1) des Interferometers bestimmt werden.

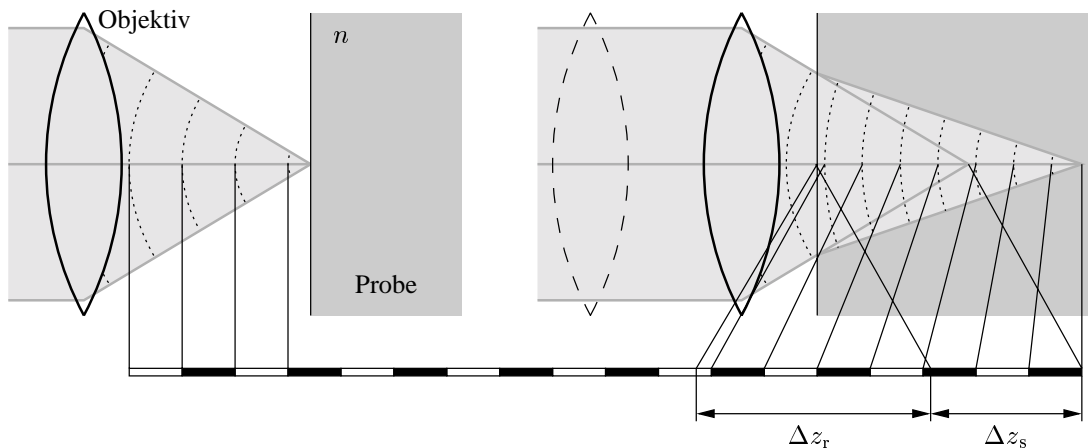


Abbildung 3.13 Ist kein Immersionsmedium mit dem Brechungsindex n der Probe vorhanden, so verlängert eine relative Bewegung des Objektivs um Δz_s in Richtung der Probe den optischen Weg im Probenarm um $\Delta z_s(n-1)n$. Diese Differenz entspricht der notwendigen Korrektur Δz_r der Referenzarmlänge.

Referenzarm, an der aktuellen Rasterposition innerhalb eines vorzugebenden axialen Intervalls von etwa 0,2 mm nach den beiden stärksten Reflexen, die zur Halbwertsbreite der axialen Punktbildfunktion passen. Die Fokussierung erfolgt dann wahlweise auf den stärkeren oder den schwächeren Reflex. Der stärkere entspricht der Probenoberfläche, sofern kein Deckglas verwendet wird. Ansonsten entspricht der stärkere Reflex der dem Objektiv zugewandten Deckglasoberseite und der schwächere Reflex der Deckglasunterseite, an der die Probe anliegt.

Damit zu fokussierende Oberflächen in einem möglichst großen Teil des Rasterbereiches nahe der Bildebene liegen, wird das konfokale Mikroskop nach Aufnahme eines lateral-lateralen Bildes in das Zentrum des Rasterbereichs bewegt. Ferner stimmt dadurch die fokussierte Rasterposition mit dem Zentrum der optionalen Rasterbewegung beim nachfolgend beschriebenen Abgleich der Referenzarmlänge überein.

Die Positionen von Proben- und Referenzarm nach dem letzten und dem vorletzten Referenzarmabgleich werden zwischengespeichert. Aus den Differenzen Δz_s und Δz_r der Werte des jeweiligen Interferometerarms wird der Brechungsindex der Probe zu

$$n = \sqrt{1 + \Delta z_r / \Delta z_s} \quad (3.1)$$

berechnet und angezeigt. Gleichung (3.1) ergibt sich aus einer geometrischen Betrachtung (Abbildung 3.13), wenn man als Brechungsindex des Immersionsmediums den Wert 1 voraussetzt. Diese Korrektur ist nicht erforderlich bei Übereinstimmung der Brechungsindizes von Immersionsmedium und Probe, also im Fall von Wasserimmersion.

Neben der lateral-lateralen Bildaufnahme für Reflexions- und optische Kohärenzmikroskopie können für jedes der beiden Mikroskopieverfahren Gewebevolumenta oder axial-laterale Schnitte aufgenommen werden, wobei die schnellste Rasterrichtung stets

lateral liegt. Dies erfordert jedoch während der Bildaufnahme einen kontinuierlichen Abgleich der Referenzarmlänge gemäß Gleichung (3.1), sobald die Bildebene in die Probe eingetreten ist. Der in die Berechnung der Abgleichgeschwindigkeit einfließende Brechungsindex der Probe kann wahlweise aus der Messung übernommen oder vorgegeben werden. Der Zeitpunkt des Erreichens der Probenoberfläche kann im praktischen Experiment nur ungenügend mit dem Beginn der Korrektur der Referenzarmlänge synchronisiert werden, primär wegen Beschleunigungsverzögerungen der Schrittmotoren, aber auch weil einige Positions- und Bewegungsparameter von der Beobachtungssituation abhängen. Entsprechende Bilddaten (George u. a. 2001) liefern zwar auch potentiell diagnostisch nutzbare Informationen, allerdings enthalten sie bedingt durch die fehlerhafte Synchronisation Artefakte, weshalb eine axiale Bewegung bedingende Bildaufnahmemodi in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert werden. Die Artefakte können mittels der abgleichsabhängigen axialen Punktbildfunktion (Abschnitt 3.2.1) erklärt werden.

Abgleich der Referenzarmlänge

Zum Auffinden der Motorposition im Referenzarm, bei der die Referenzarmlänge abgeglichen ist, durchfährt der Motor ein vorzugebendes Intervall von üblicherweise 0,2 mm, welches die abgeglichene Referenzarmlänge enthält. Dabei werden mit einer Abtastdichte von $100/\lambda_0$ und einer Abtastrate von 1 kHz auf einem der fünf Eingangskanäle Daten akquiriert. Optional kann währenddessen das konfokale Mikroskop in x_s -Richtung eine harmonische Bewegung um die x_s -Koordinate des Zentrums des Rasterbereichs mit einstellbarer Amplitude und fester Frequenz 10 Hz ausführen. Innerhalb von Zellverbänden sind Reflexe in der Regel relativ zur Größe des Rasterbereichs homogen verteilt. In einem solchen Fall sorgt die optionale Rasterbewegung dafür, daß im Mittel eine Reflexion aus dem Probenarm und damit eine Interferenz im Detektionsarm vorliegt. Aus einem Ensemble von jeweils 20 aufeinanderfolgenden Meßwerten wird die Varianz berechnet. Von den so gewonnenen Varianzen (Abbildung 3.14 *rechts*) werden alle Werte herangezogen, die größer als 5% des jeweiligen Maximalwerts sind. Aus diesen Werten wird der gewichtete Mittelwert der Ortskoordinaten errechnet, wobei die Gewichtungsfaktoren durch die Werte selbst gegeben sind. Das Ergebnis wird als die Motorposition angenommen, bei der die Referenzarmlänge abgeglichen ist.

Alternativ zu den Varianzen könnten auch die Mittelwerte der Ensemble verwendet werden (Abbildung 3.14 *links*). Jedoch entfällt bei den Varianzen ein vorhandener Untergrund, der die Dynamik verringern würde und bei der Auswertung berücksichtigt werden müßte. Zudem ist Punktverteilung um die abgeglichene Position $\Delta z = 0$ für die Varianzen schmaler und höher, was eine genauere Ortsauflösung bei verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis verspricht. Jeder der fünf Eingangskanäle kann zur Auswertung herangezogen werden. Allerdings erreichen die von den Lock-In-Verstärkern kommenden Kanäle bei eingeschalteter Phasenmodulation eine höhere Dynamik. Die Software wertet die Varianzen des \mathcal{H}_{1X} -Kanals aus. Die statistische Streuung einer damit ermittelten Position liegt bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei $0,65 \mu\text{m}$.

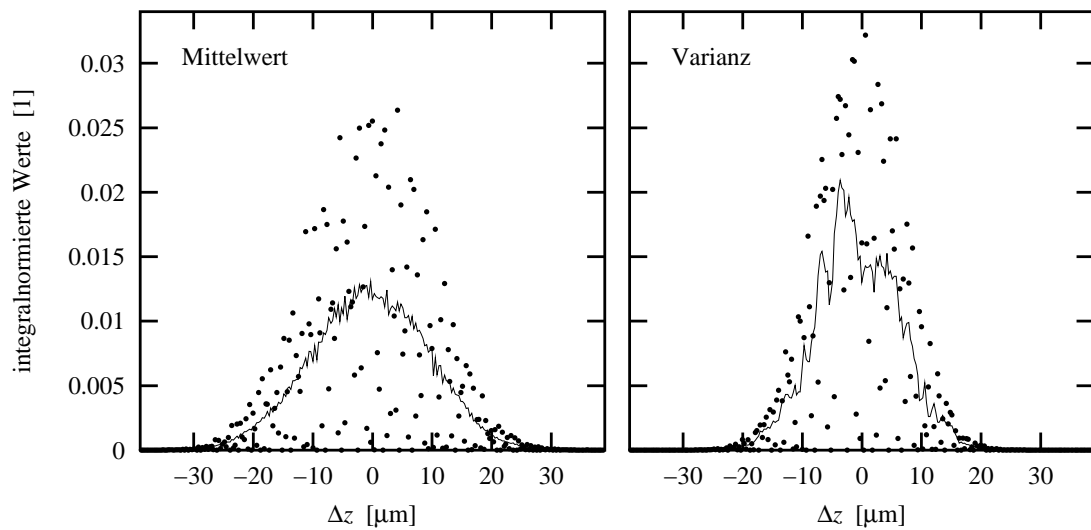


Abbildung 3.14 Abgleich der Referenzarmlänge durch Messung der Mittelwerte oder Varianzen von Ensembles von Meßwerten des \mathcal{H}_{1X} -Kanals bei optionaler Rasterung. Die eingezeichnete Linie gibt jeweils einen zentrierten *Moving Average* über 15 benachbarte Punkte an und dient ausschließlich der groben Veranschaulichung der Punktverteilungsgeometrien.

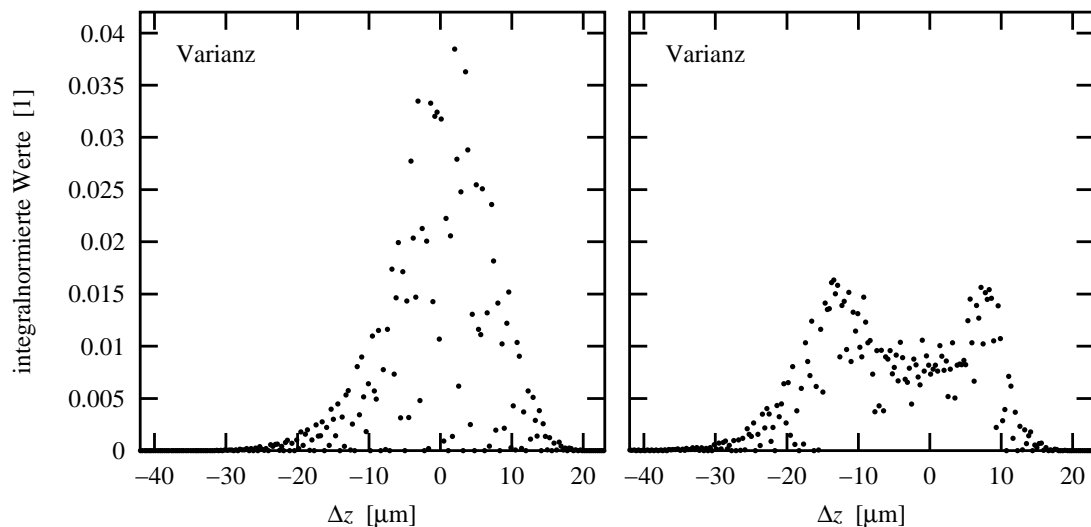


Abbildung 3.15 Einfluß einer defokussierten, starken Reflexion auf den Abgleich der Referenzarmlänge. Die Messung erfolgte unter Verwendung des \mathcal{H}_{1X} -Kanals ohne optionale Rasterung. Als Objekt wurde ein Spiegel verwendet. *Links*: Befindet sich der Spiegel im Fokus, ergibt sich eine symmetrische Punktverteilung um die abgeglichene Position $\Delta z = 0$. *Rechts*: Ist der Spiegel defokussiert, so verursacht er eine asymmetrische Punktverteilung, deren Zentrum nicht mit der abgeglichenen Position übereinstimmt.

Der vorgestellte Algorithmus ermöglicht einen Abgleich der Referenzarmlänge, ohne das konfokale Mikroskop lateral auf einen Reflex in der aufzunehmenden Bildebene einstellen zu müssen. Er arbeitet in der Praxis robust und mit vernachlässigbarer

statistischer Streuung. Systematische Fehler treten aber auf, wenn im Objekt eine defokussierte Ebene starke Reflexe enthält (Abbildung 3.15), was im Zusammenhang mit der abgleichsabhängigen axialen Punktbildfunktion (Abschnitt 3.2.1) diskutiert wird.

Einstellung der Modulationsamplitude

Um die erforderliche (Abschnitt 3.1.5) Einstellung der Modulationsamplitude A_{mod} durchzuführen, muß A_{mod} nach Gleichung (2.45) in Einheiten der Zentralwellenlänge λ_0 , also absolut, meßbar sein. Das bereits erwähnte Verfahren (Anhang B.1.4) ist aber wegen des damit verbundenen Umbaus des konfokalen Mikroskops nicht praktikabel.

Naheliegender scheint zunächst, das zeitabhängige, periodische Detektorsignal (Abbildung 2.7) aufzunehmen und an dieses ein der Gleichung (2.39) entsprechendes Modell numerisch anzupassen. Die Modulationsamplitude würde dann als Modellparameter zurückgeliefert, und die Amplitude U_{mod} der Anregungsspannung könnte korrigiert werden. Nach wenigen Iterationen wäre so die Amplitude adaptiv eingestellt. Eine solche nichtlineare Anpassung führte jedoch angesichts unzureichend genau bekannter Startparameter zu Konvergenzproblemen. Die Startparameter können weiter eingeschränkt werden, wenn es gelingt, die Zahl N_{extr} der Extremstellen des Detektorsignals pro Periode zu bestimmen. Denn es wurde hergeleitet, daß mit $\eta = (A_{\text{mod}}/\lambda_0) \perp 4$, $\hat{\varphi}_{\text{mod}} = \frac{\pi}{2} |(\varphi_{\text{mod}} \bmod \pi) - \frac{\pi}{2}|$ und $\theta = \frac{\eta}{2} + \frac{1}{4}(1 - (-1)^\eta)$

$$N_{\text{extr}} = 2(\eta + 1) + 1 - (-1)^\eta \operatorname{sgn}(\hat{\varphi}_{\text{mod}} - (-1)^\eta(k_0 A_{\text{mod}} - \theta\pi)) \quad (3.2)$$

gilt, woraus sich unter anderem ableitet, daß

$$\frac{(N_{\text{extr}} - 4) \lambda_0}{8} \leq A_{\text{mod}} \leq \frac{(N_{\text{extr}} - 4) \lambda_0}{8} + \frac{\lambda_0}{2}. \quad (3.3)$$

Ferner bleibt das Verfahren unattraktiv, weil die Montage eines Objektes hoher Reflektivität erforderlich wäre, da die Ausgangsspannung des Detektors ausgewertet wird.

Durch eine abweichend eingestellte Modulationsamplitude werden die Anteile der ersten und zweiten Harmonischen gemäß Gleichung (2.42) relativ zueinander ungleich gewichtet. Dies wurde zur manuellen Einstellung der Modulationsamplitude ausgenutzt. Dabei erweist sich die zeitabhängige Beobachtung der Harmonischen an einem Bildpunkt als wenig hilfreich, weil sich die Phasenlage φ_{mod} selbst bei einer durch ein geöffnetes Fenster bedingten Luftzirkulation nur mit einer Zeitkonstante von etwa 10 s um mehr als $\frac{\pi}{2}$ ändert. Eine künstliche Verschiebung der Phasenlage kann durch Rasterung eines geeigneten Objekts erreicht werden. Im Fall von Zellverbänden treten bei ausreichend großem Rasterbereich alle Phasenlagen gleichberechtigt auf, so daß auch im Bild beide Harmonischen zu gleichen Teilen jeweils dominieren. Die Gewichtung der Beträge der Harmonischen eines Bildes kann in der Software interaktiv mit einem Regler korrigiert werden, der dem Parameter $F \in [0, 1]$ zugeordnet ist. Während der Änderung des F -Parameters wird, Gleichung (2.45) erweiternd, das Bild

$$I_{\text{OCM}} = (F \mathcal{H}_1)^2 + ((1 - F) \mathcal{H}_2)^2 \quad (3.4)$$

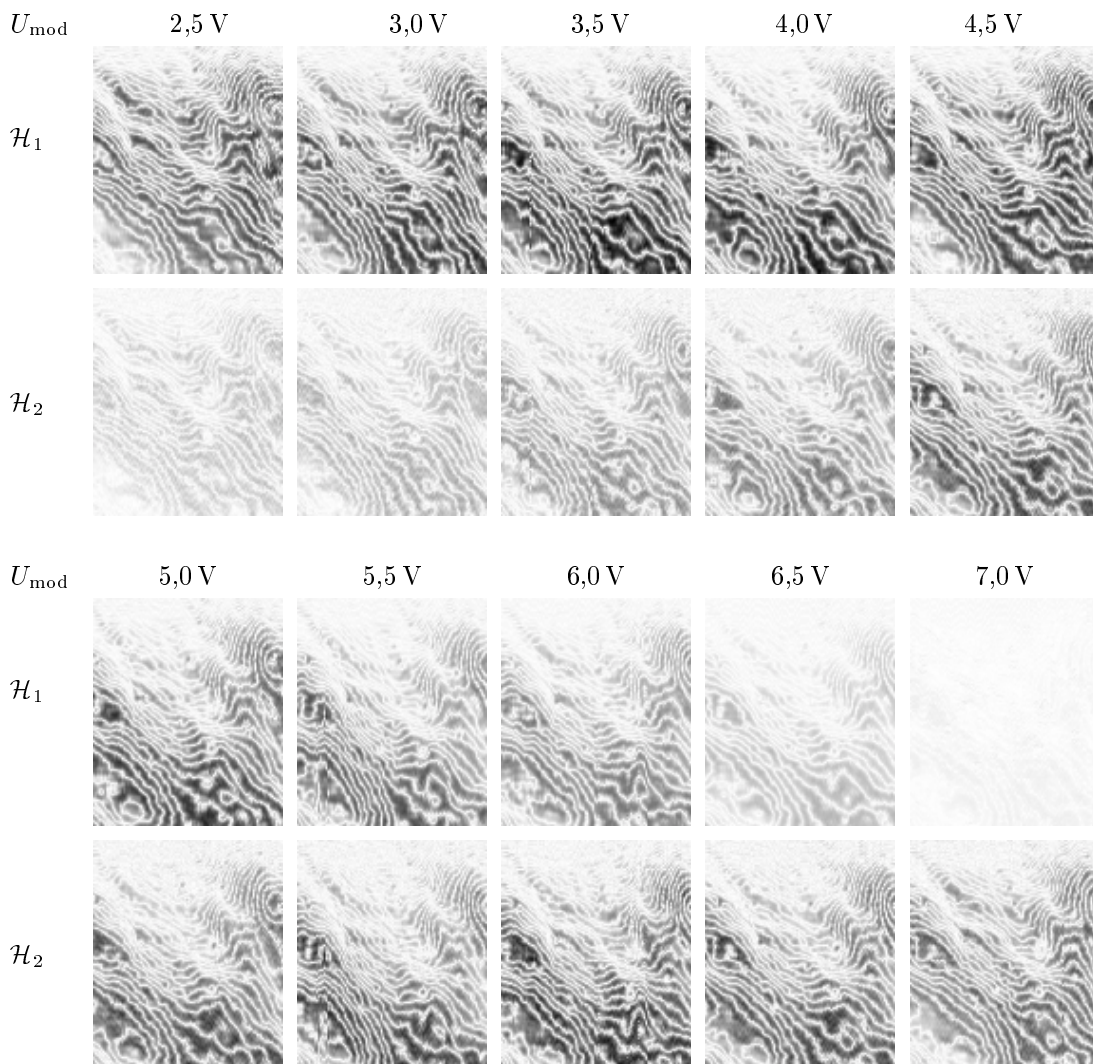


Abbildung 3.16 Harmonische \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 in Abhängigkeit der Amplitude der Phasenmodulation im Referenzarm, die über die am Funktionsgenerator eingestellten Spannungsamplitude U_{mod} eingestellt wird. Gezeigt ist zur besseren Detailtreue nur der $50 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ große Ausschnitt aus Abbildung 3.23. Bei der Ermittlung der Datenpunkte in Abbildung 3.17 wurde der gesamte Rasterbereich herangezogen.

angezeigt. Erscheint die Gewichtung der Harmonischen für $F < 0,5$ optimal, so ist die Modulationsamplitude zu klein. Für $F = 0,5$ ist sie korrekt und für $F > 0,5$ zu groß. Über den so ermittelten Wert von F können Richtung und Betrag einer möglicherweise erforderlichen Anpassung der Modulationsamplitude abgeschätzt werden. Ferner ließe sich über die Einstellung von F der Effekt einer leicht abweichend eingestellten Modulationsamplitude kompensieren, wovon allerdings bei den in dieser Arbeit präsentierten Bildern kein Gebrauch gemacht wurde.

Da die interaktive Einstellung des F -Parameters subjektiven Einflüssen unterliegt, ist eine Automatisierung des Verfahrens nicht unmittelbar möglich. Weil aber die Gewichtung der Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 bei gegebener Modulationsamplitude A_{mod}

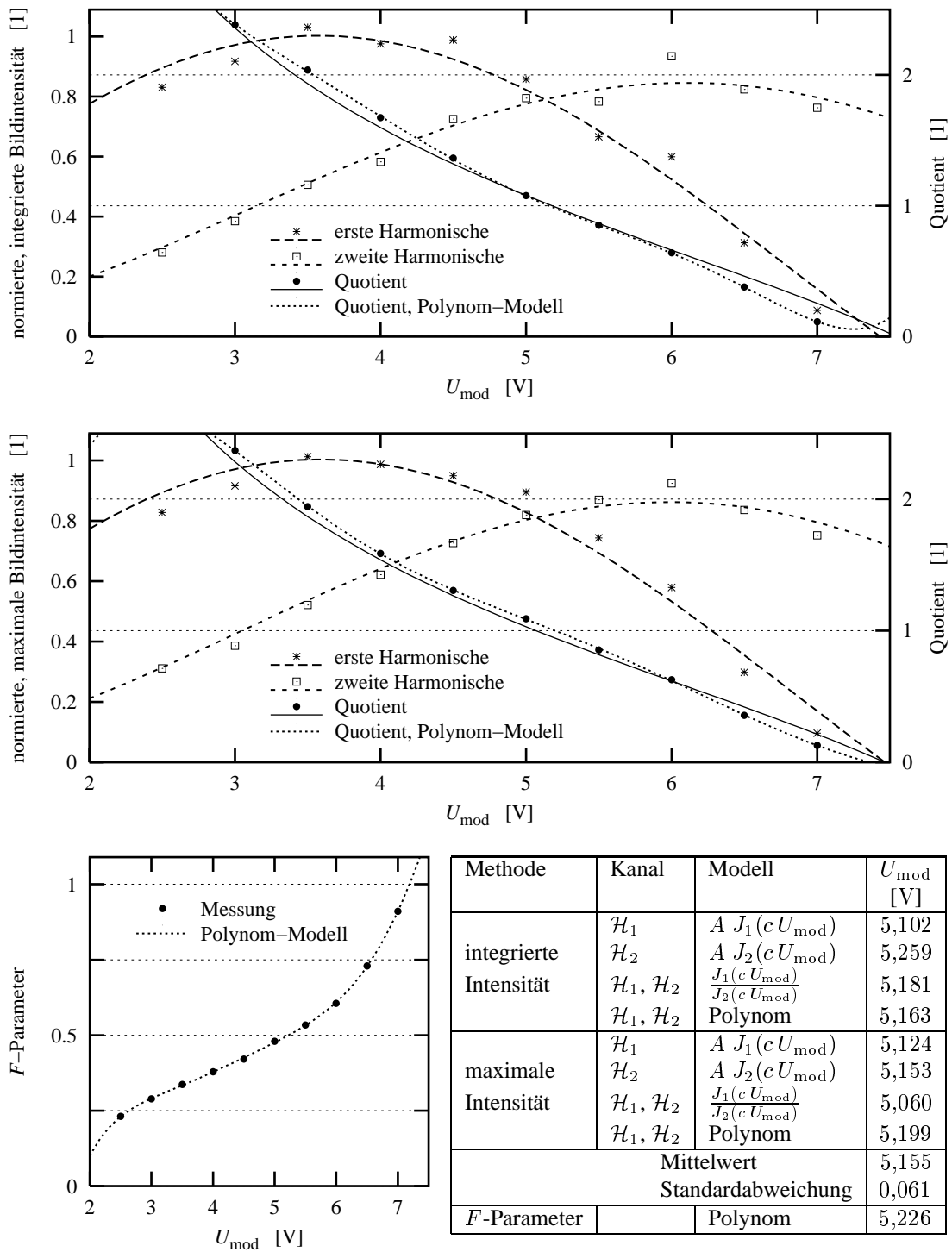


Abbildung 3.17 Einstellung der Modulationsamplitude A_{mod} , um eine Gleichgewichtung der Harmonischen zu erreichen. *Oben:* Aus den Bilddaten (Abbildung 3.16) der Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 zu verschiedenen Modulationsamplituden werden die integrierte Intensität, die maximale Intensität und für jede dieser Größen die Quotienten aus den Werten der beiden Harmonischen berechnet. An diese Daten werden die Modelle aus der Tabelle *unten rechts* numerisch angepaßt, woraus die Anregungsspannung U_{mod} als Parameter zurückgeliefert wird, bei der die Harmonischen gleich gewichtet sind. *Unten links:* Als Referenz dient der F -Parameter, der manuell jeweils so eingestellt wurde, daß die Harmonischen gleich gewichtet erschienen.

gemäß Gleichung (2.42) durch den Verlauf der BESSELfunktionen J_1 und J_2 gegeben ist, läßt sich folgendes Verfahren ableiten: Eine Serie von Bildern wird bei verschiedenen Modulationsamplituden um $A_{\text{mod}} \approx 0,20928\lambda_0$ aufgenommen (Abbildung 3.16). Aus den Bildern der Serie werden verschiedene Maße ermittelt und gegen die Modulationsamplitude aufgetragen. An die so entstandenen Kurven wird ein geeignetes Modell angepaßt, woraus U_{mod} als Modellparameter hervorgeht (Abbildung 3.17). Die Maße sind im einzelnen die integrale Intensität für jede Harmonische, die maximale Intensität für jede Harmonische, der Quotient aus den integralen Intensitäten beider Harmonischer und der Quotient aus den maximalen Intensitäten beider Harmonischer.

Generell dürften die ermittelten integrierten Intensitäten weniger streuen als die maximalen Intensitäten. Die Quotientenbildung kompensiert Veränderungen der Probe während der Aufnahme, die auf beide Harmonische gleichermaßen wirken. Es ist aber numerisch kein Aufwand, alle Modelle anzupassen und den Mittelwert der Ergebnisse zu bilden (Abbildung 3.17 unten rechts), was im Beispiel zu einer Abweichung von $\Delta U_{\text{mod}} \approx 0,07 \text{ V}$ relativ zu der mittels des F -Parameters gefundenen Referenzspannung führt. Da eine Abweichung von $\Delta U_{\text{mod}} \approx 0,1 \text{ V}$, also eine relative Abweichung von 2%, im Bild kaum bemerkbar ist, arbeitet der Algorithmus ausreichend genau.

Wesentlicher Vorteil des Verfahrens ist, daß als Objekt eine gerade zu untersuchende Gewebeprobe dienen kann, so daß die Modulationsamplitude auch intraoperativ schnell eingestellt werden kann. Um die dazu erforderliche Zeit zu reduzieren, ist in der Software die Rasterdichte zugunsten der Modulationsamplitudendichte im Vergleich zu den Abbildungen 3.16 und 3.17 verringert.

3.2 Ergebnisse

Die im Hinblick auf einen medizinischen Einsatz der optischen Kohärenzmikroskopie relevanten, mit dem beschriebenen System (Abschnitt 3.1) erzielten Ergebnisse werden in diesem Abschnitt vorgestellt. Zunächst wird die abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops definiert und vermessen. Sie ist teilweise Grundlage für die sich anschließende Illustration einiger Abbildungseigenschaften. Danach wird auf die Vermessung von Oberflächentopologien, auf Möglichkeiten zur Verbesserung des Bildeindrucks und schließlich auf eine frequenzraumbasierte Methode zur Unterscheidung von Platten- und Zylinderepithel eingegangen.

3.2.1 Abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion

Als abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion sei die axiale Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops als Funktion der Referenzarmlänge definiert. Sie wird hier als Funktion der Differenz Δz aus Referenz- und Probenarmlänge angegeben.

Zu ihrer Vermessung wurde auf einen Spiegel als Objekt fokussiert und ein Abgleich der Referenzarmlänge durchgeführt. Danach wurde die Referenzarmlänge um etwa

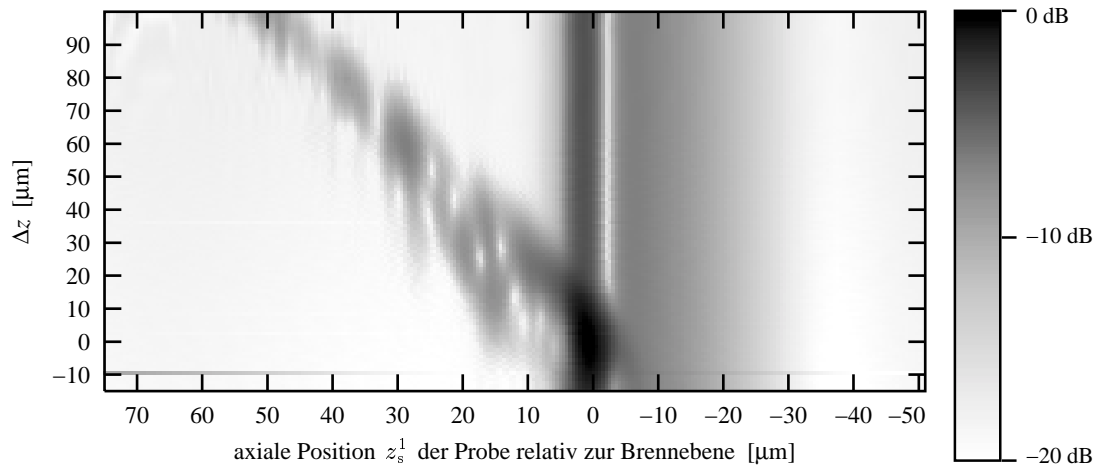


Abbildung 3.18 Vermessung der axialen Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops als Funktion der Referenzarmlänge. Es tritt unabhängig von der Referenzarmlänge ein Hintergrund auf, der der zeitversetzten Ableitung der axialen konfokalen Punktbildfunktion entspricht (Abbildung 3.19).

15 μm verkürzt. Anschließend wurde sie in Schritten von 0,5 μm verlängert, wobei nach jedem Schritt die axiale Punktbildfunktion $h_{\text{OCM}}(z_s^1)$ des optischen Kohärenzmikroskops aufgenommen wurde. Dazu wurde im Probenarm jeweils die Bildebene auf den Spiegel zubewegt, was einer Verringerung des Abstands z_s^1 des Spiegels von der Bildebene entspricht.

Zum Vergleich wurde zu jedem Schritt bei blockiertem Referenzarm die axiale konfokale Punktbildfunktion aufgezeichnet, die erwartungsgemäß unabhängig von der Einstellung Δz des Referenzarmabgleichs ist.

Dagegen hängt die axiale Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops von Δz ab (Abbildung 3.18). Um die Position des Spiegels im Probenarm tritt ein Hintergrund auf, der unabhängig von der Einstellung der Referenzarmlänge ist und die Form einer zeitversetzten Ableitung der konfokalen Punktbildfunktion hat (Abbildung 3.19 links). Daher ist davon auszugehen, daß der Hintergrund durch ein Übersprechen der fokusnah starken Intensitätsänderung auf die zu demodulierenden Frequenzen entsteht. Da sich die Bildebene während der Bildaufnahme bei der optischen Kohärenzmikroskopie nicht axial durch die Probe bewegt, tritt der Hintergrund bei der Bildaufnahme nicht auf und wird daher abgezogen.

Das Ergebnis ist die abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion (Abbildung 3.20). Zu jedem Δz wurde ihr Maximum bestimmt, wobei das absolute Maximum für $\Delta z = 0$ erreicht wird. Eine mittels gleichgewichteter, linearer Regression ermittelte Gerade durch diese Maxima illustriert, daß sich mit zunehmendem Betrag des Fehlableichs das Maximum der axialen Punktbildfunktion in Stufen immer weiter von der Position des reflektierenden Objekts entfernt. Die Ursache hierfür erkennt man anhand der Gleichung (2.33), nach welcher der axial variable Autokorrelationsterm, dessen Einhüllende die demodulierte Intensität I_{OCM} bestimmt, durch $2h_s(z_s^1)\sqrt{R_s^1}p(\Delta z)$ gegeben ist.

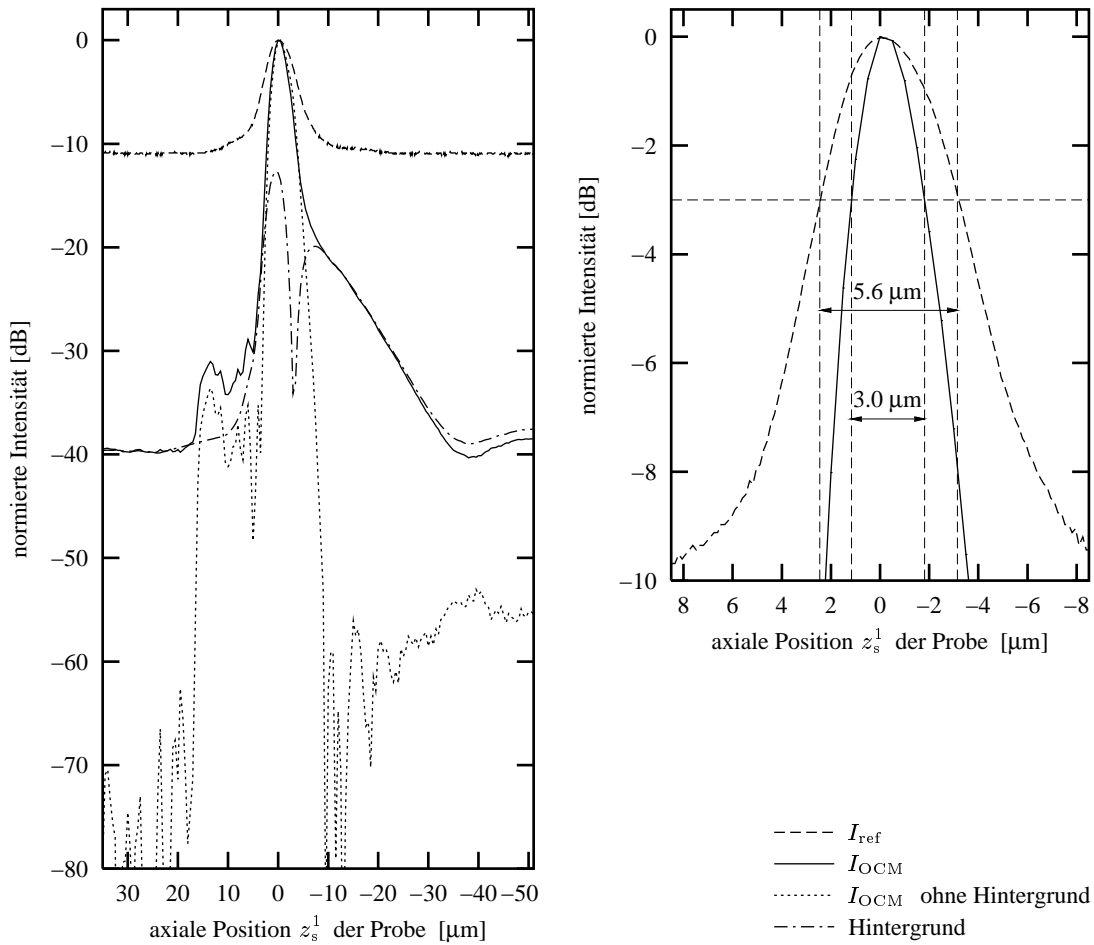


Abbildung 3.19 Tiefenauflösung und Dynamik des optischen Kohärenzmikroskops. Links: Konfokale axiale Punktbildfunktion des Reflexionsmikroskops und die axiale Punktbildfunktion des Kohärenzmikroskops. Letztere ergibt sich als Schnitt durch die Verteilungen aus den Abbildungen 3.18 und 3.20 entlang der Linie $\Delta z = 0$. Rechts: Detailansicht zur Vermessung des axialen Auflösungsvermögens.

Die demodulierte Intensität ist somit nicht allein der Einhüllenden von $p(\Delta z)$ proportional, die ihr Maximum um $\Delta z = 0$ hat, sondern auch der konfokalen axialen Punktbildfunktion h_s des Objektivs an der Stelle der aktuellen Defokussierung z_s^1 . Für die abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion h_{OCM} gilt also:

$$h_{\text{OCM}}(z_s^1, \Delta z) \sim h_s(z_s^1) \frac{p(\Delta z)}{\cos(2k_0 \Delta z)} \quad (3.5)$$

Ist daher die Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle ausreichend genau bekannt, kann mit hoher Dynamik die konfokale axiale Punktbildfunktion des Objektivs vermessen werden. Umgekehrt kann das Spektrum der Lichtquelle bei Kenntnis der konfokalen axialen Punktbildfunktion ermittelt werden. Die durch die Maxima gelegte Gerade (Abbildung 3.20) sollte für eine monochromatische Quelle durch $z_s^1 = 0$ gegeben sein und mit zunehmender Bandbreite der Lichtquelle gegen die Gerade $\Delta z = z_s$ konvergieren.

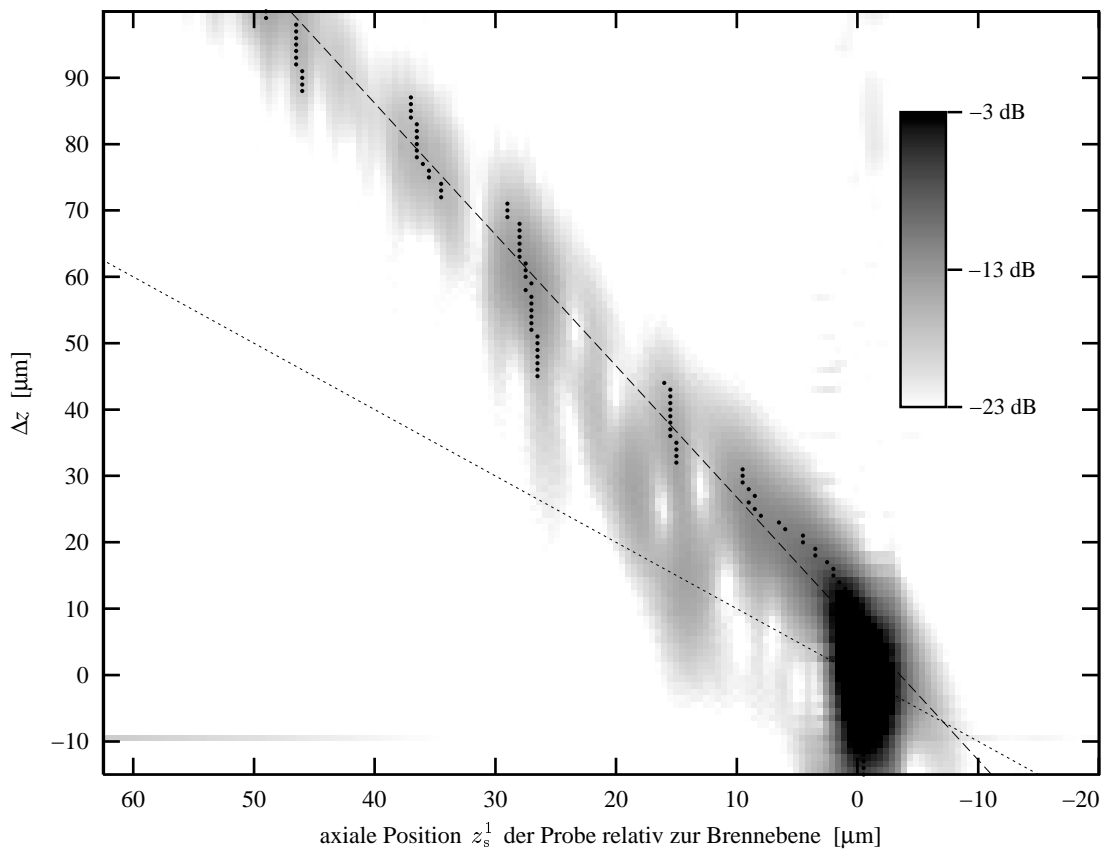


Abbildung 3.20 Abgleichsabhängige axiale Punktbildfunktion $h_{\text{OCM}}(\Delta z, z_s^1)$ des optischen Kohärenzmikroskops. Die eingezeichneten Punkte markieren jeweils die maximale Intensität bei gegebenem Δz . Die gepunktete Linie ist die Lösung von $\Delta z = z_s^1$.

Ein Algorithmus für den Abgleich der Referenzarmlänge (Abschnitt 3.1.6) kann vor diesem Hintergrund nicht korrekt arbeiten, wenn in einer defokussierten Ebene $z_s = z_s^1 \neq 0$ eine starke Reflexion vorliegt. In einem solchen Fall wird nämlich das von dem Algorithmus auszuwertende Signal (Abbildung 3.15 *rechts*) durch eine Verteilung überlagert, die als der Schnitt durch die abgleichsabhängige Punktbildfunktion entlang der Koordinate z_s^1 gegeben ist. Prinzipbedingt darf also bei der optischen Kohärenzmikroskopie eine Probe, mittels derer in verschiedenen Tiefen ein Abgleich der Referenzarmlänge durchgeführt werden soll, axial keine wesentlichen Schwankungen des Reflexionsvermögens aufweisen.

Die axiale Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops bei abgeglichenem Referenzarm (Abbildung 3.19) hat eine Halbwertsbreite von nur $3,0 \mu\text{m}$, was beinahe doppelt so gut ist wie die axiale Auflösung des konfokalen Mikroskops. Auch der Dynamikumfang ist, selbst ohne Abzug des Hintergrundes, mit 39 dB um 28 dB größer als beim Reflexionsmikroskop. Zieht man den Hintergrund ab, so wird eine Dynamik von über 50 dB erreicht, was vergleichbar mit dem mit einem anderen Aufbau erreichten Wert von 60 dB (Izatt u. a. 1996) ist.

Das Konzept der abgleichsabhängigen axialen Punktbildfunktion $h_{\text{OCM}}(z_s^1, \Delta z)$ charakterisiert das Abbildungsverhalten ausschließlich auf der optischen Achse. Es wird in Form der abgleichsabhängigen Punktbildfunktion $h_{\text{OCM}}(x_s, y_s, z_s^1, \Delta z)$ auf vier Dimensionen verallgemeinert.

3.2.2 Abbildungsstörungen

Dieser Abschnitt behandelt einige Phänomene, die die Abbildungsqualität des optischen Kohärenzmikroskops negativ beeinflussen und zum Teil beim Entwurf eines endoluminalen Systems (Kapitel 5) berücksichtigt werden müssen.

Speckles

Der Verlauf der abgleichsabhängigen Punktbildfunktion bedingt ein Übersprechen von Reflexionen aus defokussierten Ebenen in die Bildebene (Abschnitt 3.2.1). Durch die Überlagerung der abgleichsabhängigen Punktbildfunktionen mehrerer defokussierter Reflexionen entsteht ein Specklemuster, welches die axiale und die laterale Auflösung vermindert. Das Specklemuster hängt von der räumlichen Dichte der Reflexionszentren ab und nimmt daher mit dem Streukoeffizienten μ_s der Probe an Intensität zu. Es ist demnach objektabhängig und in Gewebeproben in der Regel präsent, was zur Klassifikation des Objekts herangezogen werden kann (Abschnitt 3.2.7). Als Beispielobjekt diene eine einlagige Zellschicht einer Zwiebelmembran, welche adhäsiv ein Deckglas kontaktiert (Abbildung 3.21 *links*). Liegt die Bildebene zwischen Deckglas und Probe, so beobachtet man dort ein Specklemuster, welches von den tieferliegenden Reflexionen der sich berührenden Zellmembranen verursacht wird.

Einen weiteren Effekt stellen Interferenzen innerhalb der Probe dar, die zwischen fokushen Reflexionen auftreten, deren axialer Abstand kleiner als die Kohärenzlänge ist. Beispielsweise würden zwei Reflexionen im axialen Abstand $\lambda_0/4$ zu einer nahezu vollständigen destruktiven Interferenz der Interferenzstreifenmuster führen. Mit zunehmendem axialen Abstand verringert sich der erreichbare Grad der Auslöschung. Leicht interpretierbar sind Zwei- oder Mehrschichtinterferenzen, die beispielsweise zwischen Deckglas und Probenoberfläche (Abbildung 3.21 *links*) oder innerhalb der Probe (Abbildung 3.21 *rechts*) auftreten können. Die epithelialen Zellverbände des Verdauungstrakts haben Zellgrößen zwischen $5 \mu\text{m}$ und $40 \mu\text{m}$, so daß in ihnen die Grenzflächen relativ zur Ausdehnung der Fokusregion dicht liegen und einen hohen Krümmungsradius haben. Dadurch sind die sich ausbildenden Interferenzen nicht interpretierbar, sondern es kommt zu Specklebildung.

Demnach lassen sich zwei Arten von Speckles unterscheiden, nämlich jene, die aufgrund der abgleichsabhängigen Punktbildfunktion aus Reflexionen in defokussierten Ebenen entstehen, und jene, die ihre Ursache in Mehrfachinterferenzen aus Reflexionen innerhalb der Fokusregion haben. Beide Arten sind daher objektabhängig, und die Größe der einzelnen Speckles und des Specklefeldes werden mit zunehmender axialer

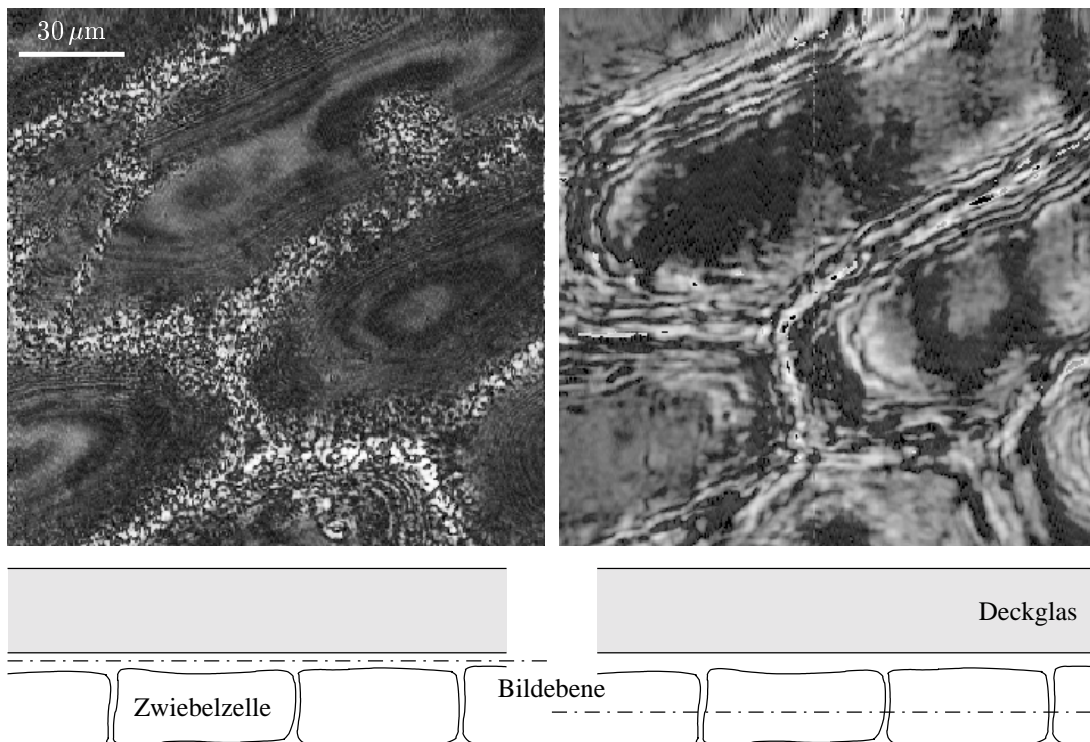


Abbildung 3.21 Optische Kohärenzmikroskopie einer einfachen Lage aus Zwiebelzellen durch ein Deckglas. *Links* liegt die Bildebene zwischen dem Deckglas und den Zellen, und man erkennt eine Zweischnittinterferenz zwischen Deckglasunterseite und der gewölbten Membran. Die stark reflektierenden, axial orientierten Membranteile zwischen den Zellen erzeugen ein Specklemuster, da für sie der Referenzarm nicht abgeglichen ist. *Rechts* liegt die Bildebene innerhalb der Zellen, und man erkennt die Zweischnittinterferenz zwischen benachbarten Membranen. Die Regelmäßigkeit des Streifensystems deutet auf eine monotone Änderung des Membranabstandes hin. Die Interferenz entsteht eindeutig innerhalb der Probe und nicht innerhalb des Interferometers, da sie in beiden Harmonischen vorliegt und daher nicht mit der Objektphase korreliert ist.

Auflösung von Objektiv oder Kohärenzfilter geringer. Die durch die abgleichsabhängige Punktbildfunktion hervorgerufenen Speckles werden zudem durch die Form der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters und die der axialen konfokalen Punktbildfunktion beeinflusst. Beide sollten demnach nur geringe Nebenmaxima haben.

Im Reflexionsmikroskopbild könnten Speckles nur durch Mehrfachinterferenzen in der Fokusregion entstehen, da bei blockiertem Referenzarm die abgleichsabhängige Punktbildfunktion keinen Einfluß hat.

Objektphasenkorrelierte Streifenartefakte

Das Bild des optischen Kohärenzmikroskops wird gemäß Gleichung (2.45) aus den beiden Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 berechnet, wobei eine der beiden Harmonischen

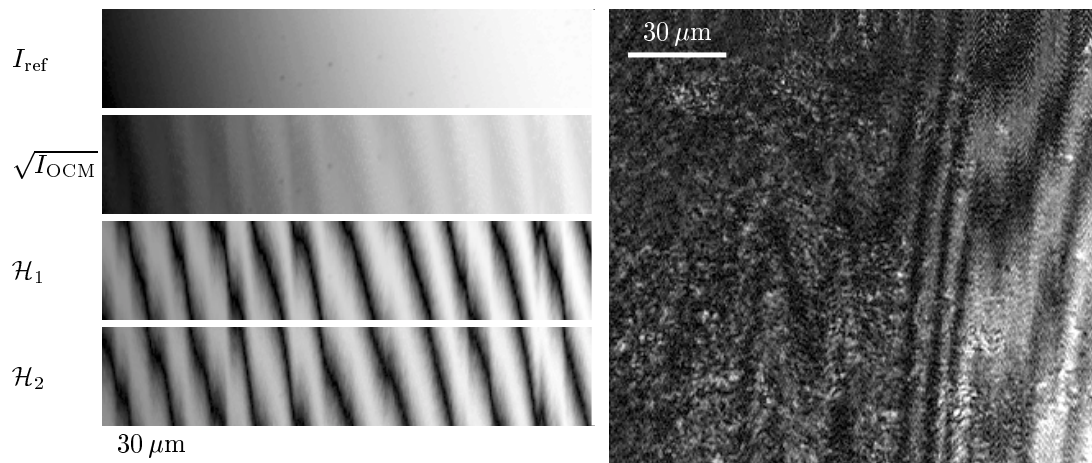


Abbildung 3.22 Artefakte in Form von Streifen bei der optischen Kohärenzmikroskopie. *Links:* Spiegeloberfläche, die von links nach rechts in die Bildebene des konfokalen Mikroskops hineinläuft. Im Reflexionsmikroskopbild I_{ref} steigt die Intensität gleichmäßig an, während beim Kohärenzmikroskopbild I_{OCM} Streifen mit der Ortsfrequenz der Streifen in den Harmonischen auftreten. *Rechts:* Bei dieser Gewebeprobe kommt die Bildebene am rechten Bildrand dem stark reflektierenden Wasserfilm an der Gewebeoberfläche sehr nahe, wodurch dessen Streifenartefakt dort das Bild zunehmend dominiert.

abhängig von der Objektphase jeweils dominiert (Abschnitt 2.2.3). Diese komplementäre Addition zu einer dem Reflexionsvermögen der Probe proportionalen Größe erfolgt jedoch nicht genau dem mathematischen Ideal entsprechend. In einem solchen Fall bildet sich ein Streifensystem aus, welches mit dem Verlauf der Harmonischen und daher mit der Objektphase korreliert ist. Dies fällt insbesondere bei planaren und homogen reflektierenden Phasenobjekten auf (Abbildung 3.22 *links*).

Wie die Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops zeigen wird (Kapitel 4), sind solche Streifen prinzipiell unvermeidbar, können aber durch eine Fehljustage der optischen Achse des Kollimators im Referenzarm verstärkt werden. Der justageabhängige Effekt macht sich besonders bei geringen Signalstärken bemerkbar. Letzteres gilt beispielsweise für die fokussierte, schwache Reflexion der einer Probe zugewandten Deckglassseite oder für die defokussierte, starke Reflexion eines die Probe benetzenden Wasserfilms (Abbildung 3.22 *rechts*).

3.2.3 Vermessung der Topologie von Oberflächen

Die Darstellung von Oberflächen fällt bei der optischen Kohärenzmikroskopie gegenüber der Reflexionsmikroskopie aufgrund der deutlich besseren axialen Auflösung (Abschnitt 3.2.1) und der leicht besseren lateralen Auflösung (Abschnitt 3.1.4) schärfer und kontrastreicher aus (Abbildung 3.23). Darüberhinaus folgen bei der optischen Kohärenzmikroskopie die Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 dem Verlauf der Phase des Objekts (Abschnitt 2.2), was zur Profilometrie von Oberflächen herangezogen werden

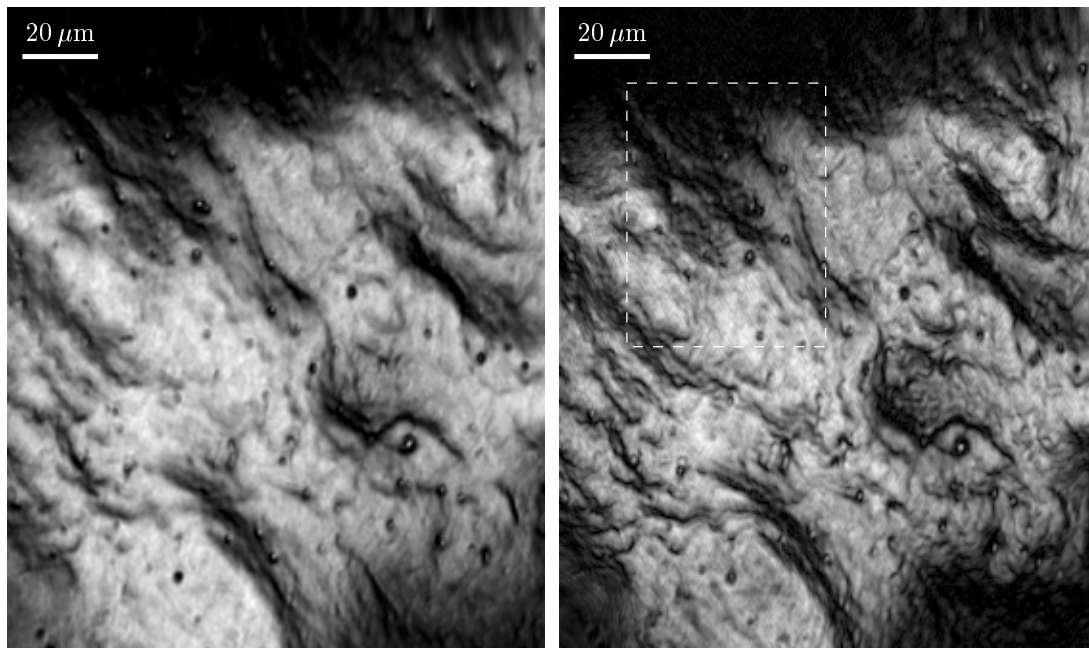


Abbildung 3.23 Oberfläche eines getrockneten Ösophagus des Schweins. *Links* das Bild I_{ref} der Reflexionsmikroskopie mit einem Signal-Untergrund-Abstand von 2,0 dB, und *rechts* das Bild $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ der optischen Kohärenzmikroskopie, welches schärfer und kontrastreicher wirkt und mit 20,3 dB einen höheren Signal-Untergrund-Abstand hat. Der markierte Ausschnitt wird zur Erläuterung der Profilmessung (Abbildungen 3.24 und 3.25) herangezogen.

kann, sofern die Unebenheit der jeweiligen Oberfläche den Schärfentiefenbereich des optischen Kohärenzmikroskops nicht übersteigt. Anhand eines Beispiels (Abbildung 3.23 *rechts*) werden einfache Verfahren vorgestellt, mit denen Isophasenlinien gewonnen und dem Bild überlagert werden können.

Erzeugung von Isophasenlinien

Gemäß der Gleichungen (2.40) und (2.42) durchlaufen die Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 jeweils zwei Maxima und zwei Minima, wenn sich die Objektphase um $\varphi_{\text{mod}} = 2\pi$ und sich damit die axiale Objektposition um $\Delta z = \lambda_0/2$ ändert. Man erhält folglich vier Maxima pro $\lambda_0/2$, und damit einen Abstand der Maxima von $\lambda_0/8 = 164 \text{ nm}$.

Um aus dem Verlauf der beiden Harmonischen Isophasenlinien zu extrahieren, kann man entweder die Phaseninformation $\arctan(\mathcal{H}_{1X}/\mathcal{H}_{1Y})$ und $\arctan(\mathcal{H}_{2X}/\mathcal{H}_{2Y})$ der Lock-In-Verstärker nutzen, die in Form der X - und Y -Ausgänge direkt eingelesen wird, oder die Beträge $\mathcal{H}_1 = \sqrt{\mathcal{H}_{1X}^2 + \mathcal{H}_{1Y}^2}$ und $\mathcal{H}_2 = \sqrt{\mathcal{H}_{2X}^2 + \mathcal{H}_{2Y}^2}$ auswerten.

Die Überführung der Phaseninformation der Lock-In-Verstärker in Isophasenlinien wird in Abbildung 3.24 illustriert. Der Filter zur Linienextraktion bestimmt zunächst für jeden Lock-In-Verstärker aus einem Histogramm die Pixel, die zu der höchsten Histogrammsäule beitragen. Diese werden auf maximale Intensität gesetzt, die ver-

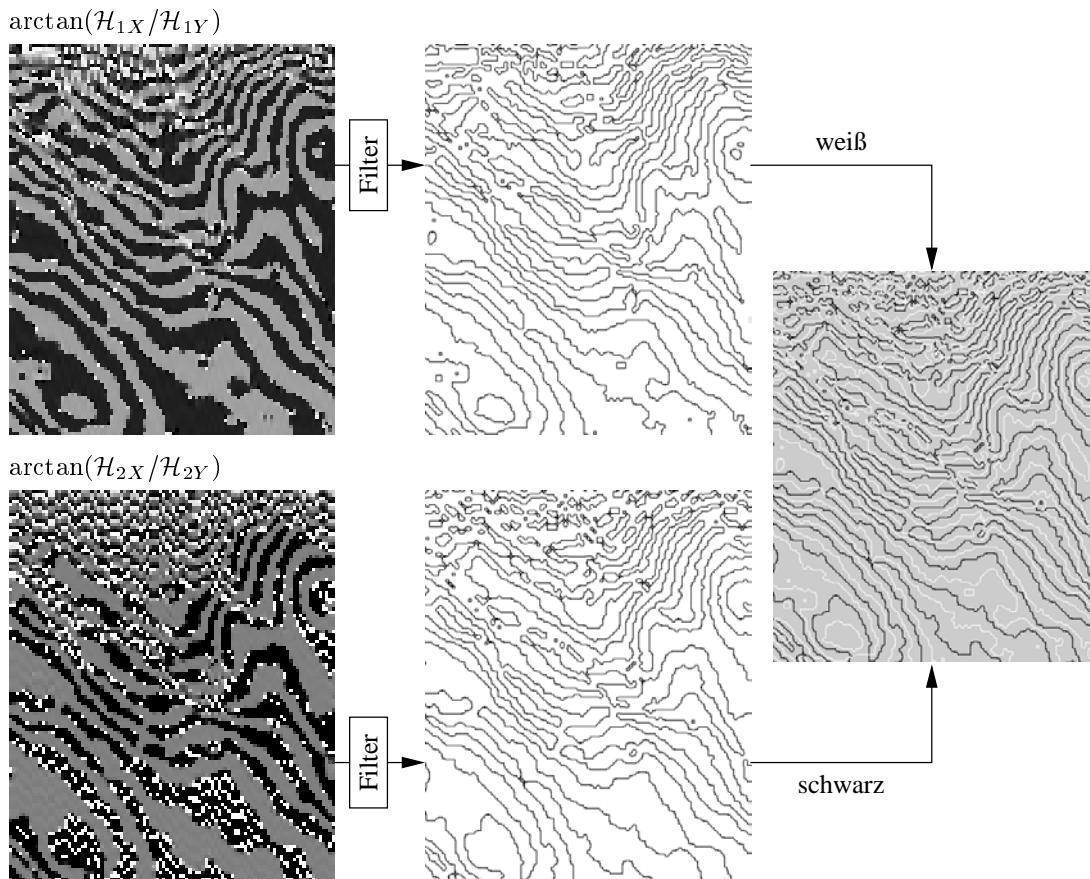


Abbildung 3.24 Erzeugung von Isophasenlinien aus den Phasen $\arctan(\mathcal{H}_{1X}/\mathcal{H}_{1Y})$ und $\arctan(\mathcal{H}_{2X}/\mathcal{H}_{2Y})$ der Harmonischen am Beispiel eines $50 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ großen Bildausschnitts (Abbildung 3.23 rechts).

bleibenden anderen auf Null. Die Histogrammsäulenbreite wurde empirisch bestimmt. Dann wird das resultierende binäre Bild auf die 16-fache Pixelflächendichte neu gerastert, und die Kanten werden mit dem CannyEdgeDetection-Algorithmus extrahiert, der in einer G-Bibliothek von LabVIEW 5.1 enthalten ist. Anschließend werden die so aus den Phasen der beiden Harmonischen bestimmten Linien überlagert.

Zur Linienextraktion basierend auf den Beträgen der Harmonischen wird gemäß Abbildung 3.25 ein binäres Bild unmittelbar aus der Bedingung $\mathcal{H}_1 > \mathcal{H}_2$ berechnet, um daraus wie beschrieben die Kanten zu extrahieren. Die Information über die Zuordnung der Linie zur Harmonischen geht so verloren.

Überlagerung der Phasen- und Bildinformation

Bei der auf der Phaseninformation der Lock-In-Verstärker basierenden Methode kann aus den beiden binären Zwischenergebnissen (Abbildung 3.24) durch eine logische Exklusiv-Oder-Operation ein binäres Bild mit doppelter Phasenauflösung gewonnen

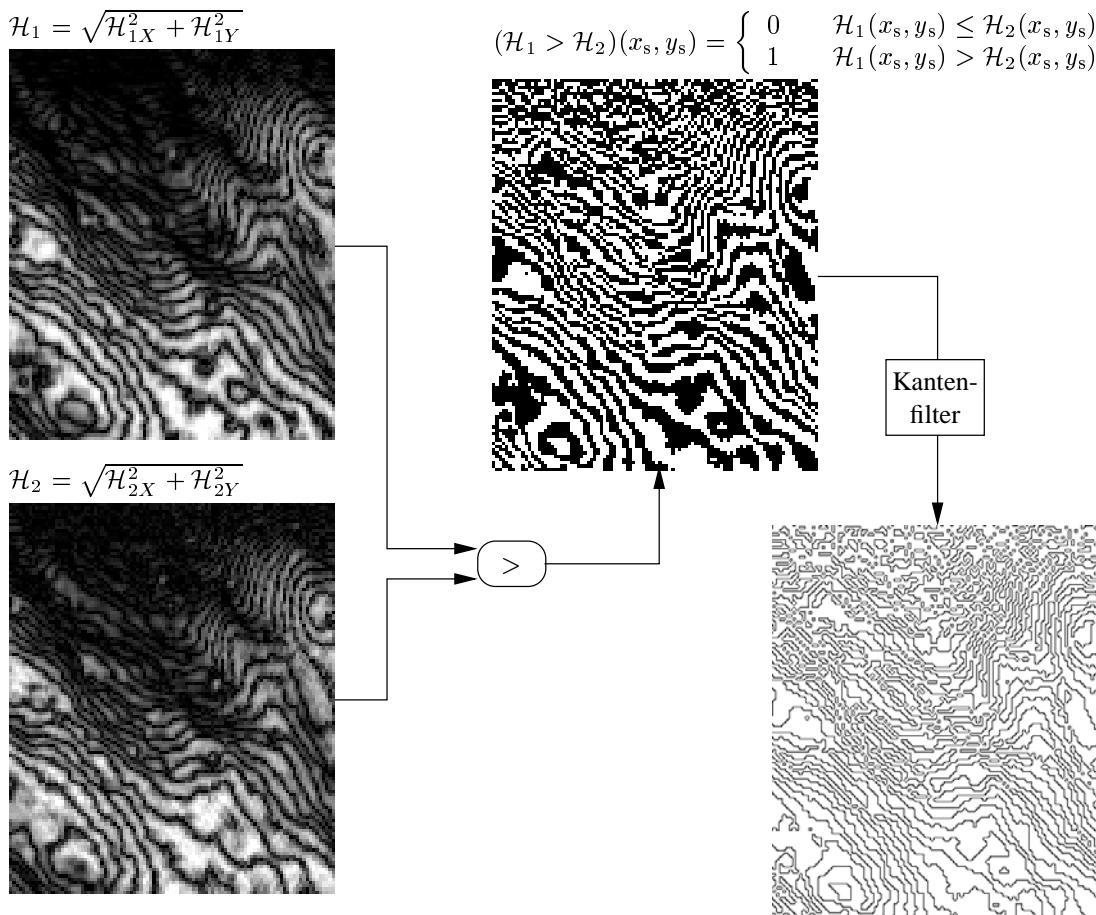


Abbildung 3.25 Erzeugung von Isophasenlinien aus den Beträgen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 der Harmonischen am Beispiel eines $50 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ großen Bildausschnitts (Abbildung 3.23 rechts).

werden. Daher steht die Phaseninformation bei beiden Verfahren prinzipiell sowohl in Form der Isophasenlinien als auch als binäres Bild zur Verfügung. Zwei Möglichkeiten zur Überlagerung der Phasen- und der Bildinformation zeigt Abbildung 3.26. Multipliziert man die Phaseninformation mit der Objektreflektivität, wird der Bildeindruck bei schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch Phasenrauschen weniger gestört.

Diskussion

Von den beiden vorgestellten Verfahren zur Bestimmung der Isophasenlinien bietet die Auswertung der von den Lock-In-Verstärkern gelieferten Phaseninformation einen besseren Rauschabstand. Dagegen hat die Extraktion der Isophasenlinien aus dem Betrag der Harmonischen den Vorteil, auf phasensensitive Demodulatoren verzichten zu können. Sie kann daher auch mit den in Kapitel 5 vorgeschlagenen Bandpaßfiltern verwendet werden, was sie zu einer kostengünstigeren und schnelleren Demodulation kompatibel macht.

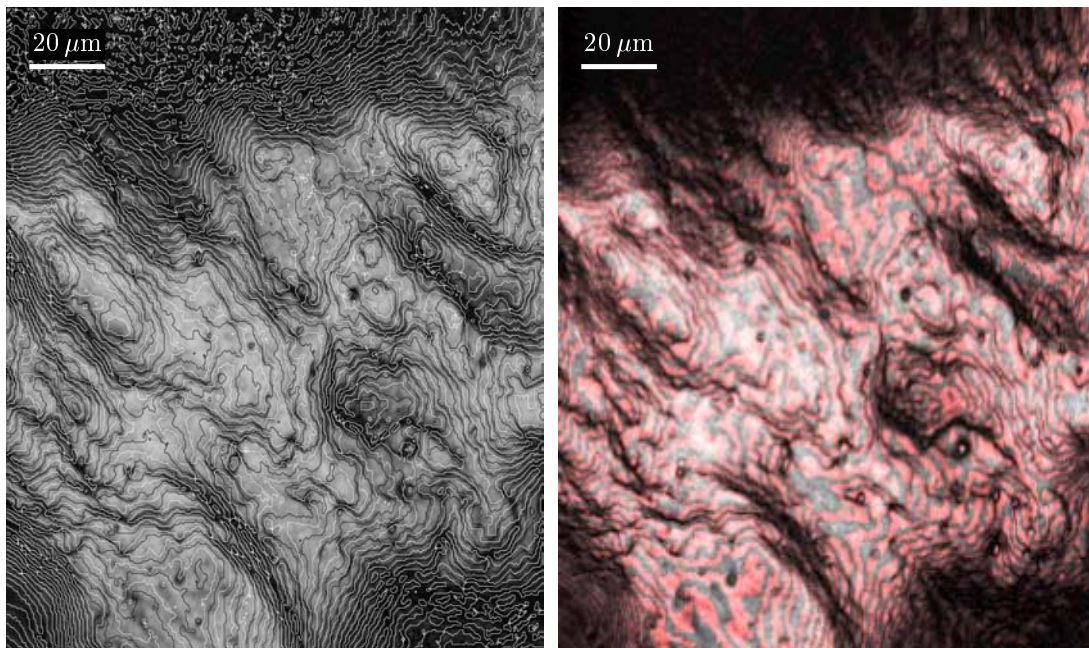


Abbildung 3.26 Überlagerung von Phasen- und Bildinformation für die kohärenzmikroskopische Aufnahme aus Abbildung 3.23. *Links*: Phaseninformation in Form von Isophasenlinien gewonnen aus den Phase der Harmonischen. *Rechts*: Phaseninformation in Form des farblich kodierten binären Bildes gewonnen aus den Beträgen der Harmonischen. Die Phaseninformation wurde dabei mit der Bildinformation multipliziert, um in den dunklen Bereichen störendes Phasenrauschen auszublenden.

Beide Verfahren arbeiten robust, benötigen keine objektabhängigen Parameteranpassungen und sind daher automatisiert durchführbar. Durch sie kann der Einsatz eines Phase-Unwrapping-Algorithmus umgangen werden, was insofern legitim ist, als daß eine dreidimensionale Darstellung der Gewebeoberfläche diagnostisch keine Zusatzinformation liefert. Die vorgestellten Möglichkeiten der Überlagerung der Phaseninformation (Abbildung 3.26) integrieren die Tiefeninformation, ohne die Aussage über die Reflektivität der Oberfläche zu beeinträchtigen.

Während der Bildaufnahme darf bei dieser Anwendung keine Verschiebung der Phasenruhelage von außen induziert werden, wozu sich Temperaturstabilität vielfach als notwendige und hinreichende Voraussetzung erwiesen hat. Eine solche Verschiebung ist leicht durch einen Parallelversatz der Isophasenlinien senkrecht zur langsamen Rasterrichtung im Bild sichtbar.

In einem Gebiet mit monotoner Ableitung und ausreichendem Rauschabstand der Phase kann die Höhe einzelner Strukturen leicht durch Abzählen der Isophasenlinien erfolgen (Abbildung 3.27). Die hierbei erreichte Genauigkeit hängt vom Objekt ab, ist besser als der Abstand $\lambda_0/8$ der Isophasenlinien und wird zu $\lambda_0/16 \approx 80 \text{ nm}$ abgeschätzt. Jedoch bleibt das generelle Problem, daß zwischen Erhebungen und Absenkung der Oberfläche nicht unterschieden werden kann.

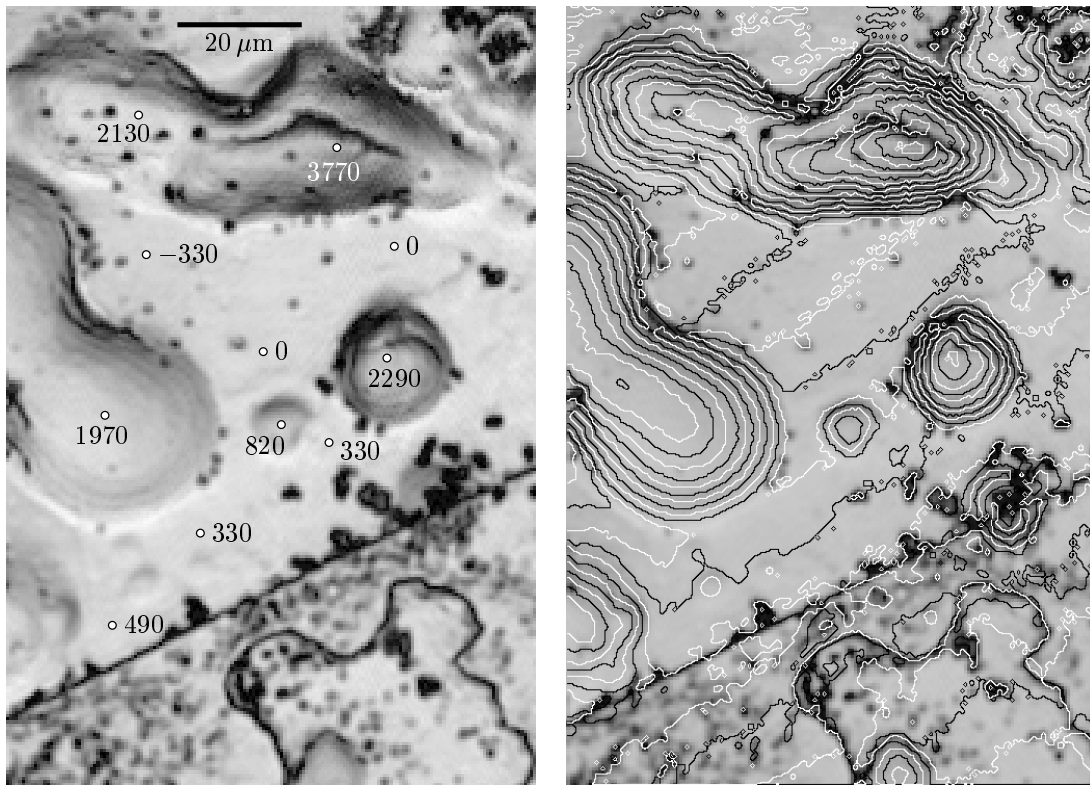


Abbildung 3.27 Profilmessung einer durch mechanische Einflüsse und Oxidation beschädigten Spiegelfläche mit dem optischen Kohärenzmikroskop unter Auswertung der von den Lock-In-Verstärkern gelieferten Phasen der beiden Harmonischen. *Links:* Die eingezeichneten Höhenmarkierungen ergeben sich durch Abzählen der Isophasenlinien als Vielfache von $\lambda_0/8$ unter Rundung auf 10 nm genau. *Rechts:* Der Kontrast wurde reduziert, um die Isophasenlinien besser erkennbar zu machen. Die aus \mathcal{H}_1 gewonnenen Isophasenlinien sind weiß eingezeichnet, die aus \mathcal{H}_2 schwarz.

3.2.4 Mutmaßliche Reduktion des Einflusses von Aberrationen

Der Speicherbereich eines EPROMs wurde in Wasserimmersion mit dem Reflexionsmikroskop und dem optischen Kohärenzmikroskop aufgenommen. Da die Objektivlinse nicht für ein Immersionsmedium ausgelegt ist, führt eine solche Konfiguration zu merklichen sphärischen Aberrationen (Abbildung 3.28). Allerdings scheinen diese im Bild des optischen Kohärenzmikroskops weniger ausgeprägt zu sein. Ursache hierfür könnte sein, daß das Kohärenzfilter nur die Wellenanteile selektiert, welche ausreichend geringe optische Weglängenunterschiede relativ zur Referenzarmlänge aufweisen. Aufgrund der in Kombination mit der konfokalen Punktbildfunktion erreichten axialen Auflösung von $3,0 \mu\text{m}$ (Abschnitt 3.2.1) entspräche der Selektionsumfang nur wenigen Wellenlängen. Sphärische Aberrationen treten auch ohne Immersionsmedium auf, wenn Ebenen in unterschiedlicher Tiefe der Probe fokussiert werden. Sie können nur vermieden werden, wenn die Brechungsindizes von Immersionsmedium und Probe übereinstimmen, also wenn ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet wird.

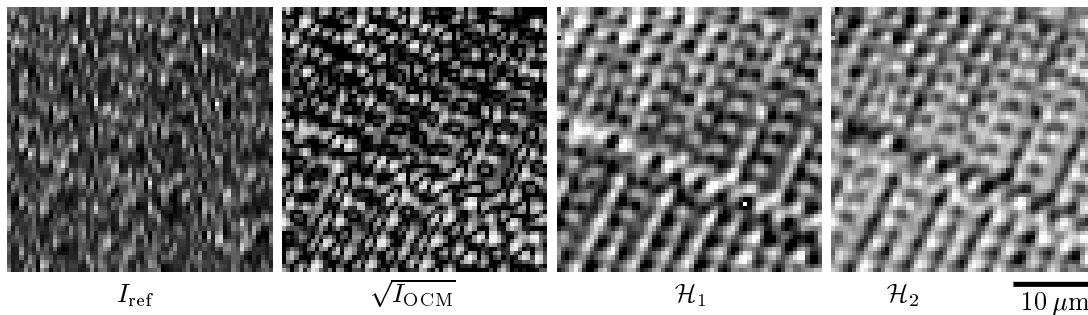


Abbildung 3.28 Speicherbereich eines EPROMs in Reflexionsmikroskopie und optischer Kohärenzmikroskopie. Die Aufnahmen erfolgten in Wasserimmersion, wodurch sphärische Aberrationen die Abbildungsqualität reduzieren. Die Bildqualität scheint aber bei der optischen Kohärenzmikroskopie besser zu sein, insbesondere tritt die in den Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 enthaltene Information über die Objektphase klar hervor.

3.2.5 Tiefpaßfilterung zur Verringerung der Specklewirkung

Ab dem unteren Ende des Ösophagus sind die Organe des Verdauungstrakts mit Zylinderepithel ausgekleidet. Dieses weist laterale Zellausdehnungen unter $10 \mu\text{m}$ auf, was eine hohe Dichte von Streu- und Reflexionsprozessen bedingt und auch fokusnah verstärkt zu Wellenfrontdeformationen führt. Als Folge bilden sich Speckles aus, welche die effektive Auflösung reduzieren (Abbildung 3.29 *oben*). Dies gilt wegen der starken Streuung besonders für das Magenepithel (Tabelle 1.1).

Eine digitale Tiefpaßfilterung kann bei sinnvoller Wahl der Filtereckfrequenz den Bildeindruck nachhaltig verbessern (Abbildung 3.29 *unten*). Die optimale Filtereckfrequenz sollte die Speckles dämpfen ohne den Kontrast zu stark zu reduzieren. Sie ist prinzipiell objektabhängig, jedoch hat sich für Bilder des Verdauungstrakts durchgehend ein Wert von $(1,9 \mu\text{m})^{-1}$ bewährt⁴.

3.2.6 Auswertung von Volumendatensätzen

Ein grundsätzliches Problem bei der Reflektometrie mit zellulärer oder subzellulärer Auflösung ist, daß einzelne Zellbestandteile eine sehr inhomogene Verteilung des Reflexionsvermögens aufweisen. Beispielsweise zeigen Zellmembranen oftmals nur an einer Stelle oder in einem begrenzten Bereich eine ausgeprägte Reflexion (Abbildung 3.29). Der Effekt einer unvollständigen Zelldarstellung wird durch die Schärfentiefe verstärkt, da sowohl konfokal als auch mit zusätzlichem Kohärenzfilter axial eine subzelluläre Auflösung erreicht werden kann, was beispielsweise beim Zylinderepithel der Fall ist. Die Darstellung von $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ erscheint gerade deshalb als vorteilhaft gegenüber

⁴Verwendet wurde ein GAUSSscher Faltungskern unter Adobe Photoshop 4.0. Dieser liefert bei Anwendung auf ein Gitter aus abwechselnd hellen und dunklen Bildzeilen bei einem Radiuswert von 2 pixel eine nahezu verschwindenden Kontrast, so daß der Radiuswert als Halbwertsbreite des Faltungsfunktion angenommen werden kann.

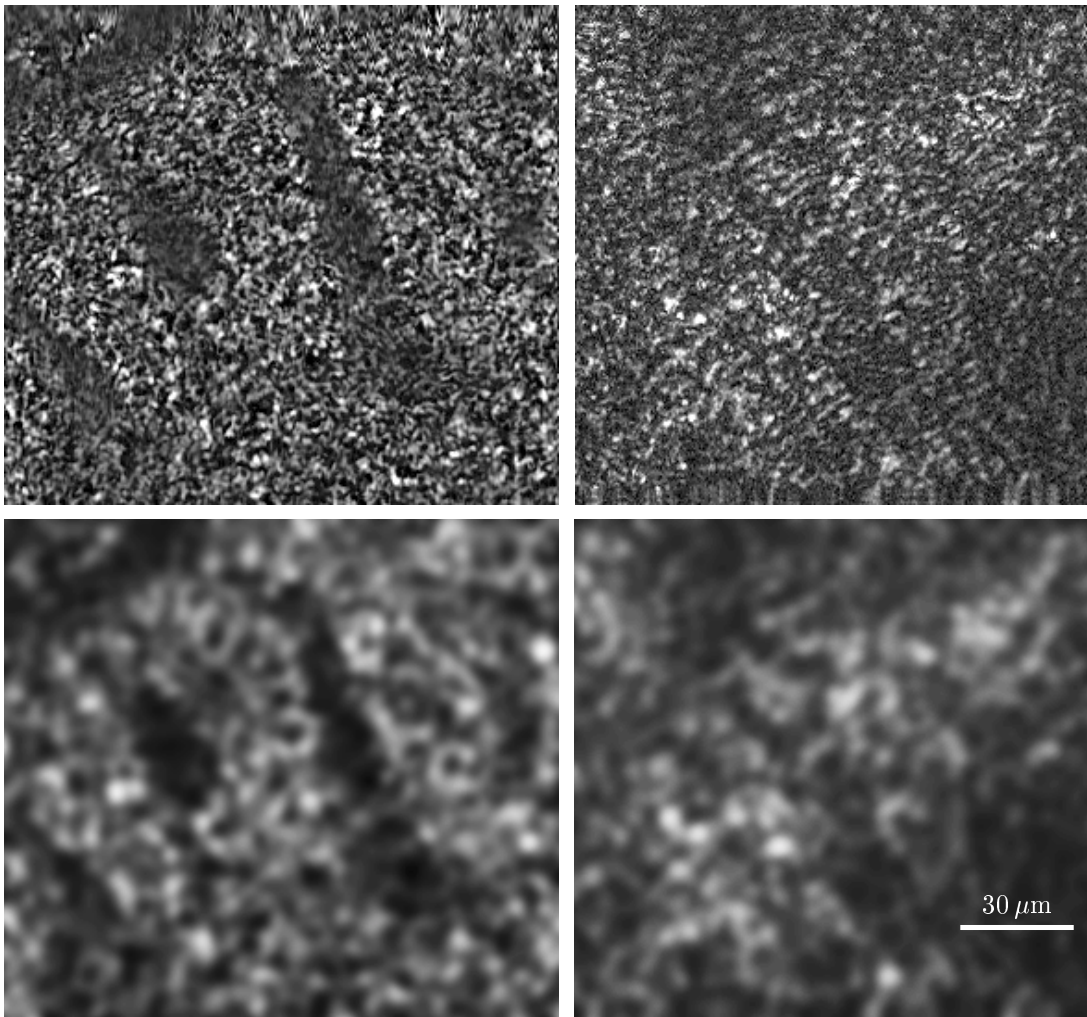


Abbildung 3.29 Anwendung eines GAUSSschen Tiefpaßfilters der Halbwertsbreite $1,9 \mu\text{m}$ zur Reduktion der den Bildeindruck störenden Speckles. *Oben* die Kohärenzmikroskopiebilder vom Epithel in etwa $10 \mu\text{m}$ Tiefe, aufgenommen etwa 1 h nach der Resektion, *unten* das Ergebnis nach Filterung. *Links* Dickdarm des Schweins, *rechts* Magen der Ratte.

der von I_{OCM} , weil bei ihr die Schärfentiefe künstlich verringert wird.

Die Vollständigkeit der Zelldarstellung kann erhöht werden, wenn man einen Volumendatensatz bestehend aus mehreren axial versetzten Bildebenen addiert (Abbildung 3.30). Das axiale Intervall, welches ein solcher Volumendatensatz umfaßt, sollte dabei in der Größenordnung der axialen Ausdehnung einer Zellschicht liegen. Deutlich ausgedehntere Intervalle würden bei einfacher Projektion zu Informationsüberlagerung und Kontrastverlust führen. Sie müßten mittels *Volume Rendering* dargestellt werden und könnten dabei die hohe axiale Auflösung von I_{OCM} ausnutzen.

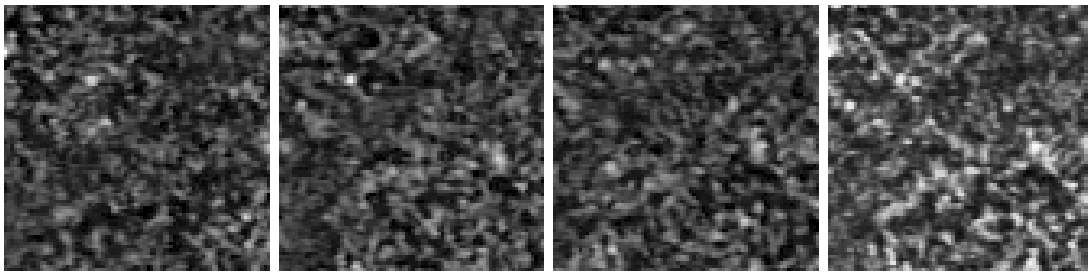


Abbildung 3.30 Bildverbesserung durch Auswertung von Volumendatensätzen. *Linke drei Bildausschnitte:* Optische Kohärenzmikroskopie des Colons einer Ratte in etwa $10\ \mu\text{m}$ Tiefe. Bildausschnitt $41\ \mu\text{m} \times 41\ \mu\text{m}$. Der axiale Abstand der Bildebenen beträgt jeweils $2\ \mu\text{m}$. *Rechts:* Die Addition der Bildebenen fördert die zusammenhängende Darstellung der Zellmembranen.

3.2.7 Unterscheidung zwischen Platten- und Zylinderepithel

Mit dem Laboraufbau wurde gezeigt, daß mit einem optischen Kohärenzmikroskop zwischen Platten- und Zylinderepithel (Anhang C) automatisiert unterschieden werden kann (George u. a. 2001, 2002). Die Ergebnisse werden hier kurz wiederholt, um Details des Verfahrens der Auswertung zu ergänzen.

Untersucht wurden frische Gewebeproben der Ratte bis zu 60 min nach ihrer Resektion. Dabei diente das Epithel des Ösophagus als Modell für das Plattenepithel und die Schleimhaut des Magens als Modell für das Zylinderepithel. In die Auswertung wurden ausschließlich Bilder der obersten Zellschicht einbezogen, die ohne Deckglas und ohne benetzenden Wasserfilm aufgenommen wurden.

Unterscheidungskriterium

Die Unterscheidung der Epitheltypen beruht darauf, daß Plattenepithelzellen an der Gewebeoberfläche lateral ausgedehnt und axial flach sind, während Zylinderepithelzellen schmal und hoch sind. Die lateralen Ausdehnungen der Zellen betragen bis zu $40\ \mu\text{m}$ (Riede u. a. 1989a) im Ösophagus, und weniger als $10\ \mu\text{m}$ im Magen (Abbildung 3.29 *rechts unten*). Die hohe laterale Zelldichte des Zylinderepithels führt zu vermehrter Specklebildung, was in der Ortsfrequenzdarstellung eines Bildes zu einem höheren Anteil hoher Ortsfrequenzen führt. Beim Plattenepithel dagegen sind Zellmembranen und subzelluläre, zusammenhängende Arreale erkennbar. Diese Strukturmerkmale finden sich in einem niedrigeren Ortsfrequenzintervall.

Speckles treten mit der Ortsfrequenz der Auflösungsgrenze auf, die für das optische Kohärenzmikroskop bei $1,45\ \mu\text{m}$ liegt (Abschnitt 3.1.4). Die Speckles werden daher bei $(1,45\ \mu\text{m})^{-1} \pm 10\%$, also in dem Ortsfrequenzintervall $K_{\text{speckle}} = [0,62\ \mu\text{m}^{-1}, 0,76\ \mu\text{m}^{-1}]$, erwartet. Die Strukturmerkmale hingegen haben Ausdehnungen zwischen $5\ \mu\text{m}$ und $40\ \mu\text{m}$, was dem Ortsfrequenzintervall $K_{\text{structure}} = [0,025\ \mu\text{m}^{-1}, 0,2\ \mu\text{m}^{-1}]$

entspricht⁵.

Aus dem azimuthal gemittelten Leistungsspektrum $P_r(\nu_r)$ eines Bildes⁶ wird durch Integration über das betreffende Ortsfrequenzintervall der Anteil der Leistung ermittelt, der jeweils in Form von Speckles oder Strukturmerkmalen übertragen wird:

$$P_{\text{speckle}} = \int_{K_{\text{speckle}}} P_r(\nu_r) d\nu_r, \quad P_{\text{structure}} = \int_{K_{\text{structure}}} P_r(\nu_r) d\nu_r \quad (3.6)$$

Die absoluten Werte von P_{speckle} und $P_{\text{structure}}$ hängen unter anderem von der Gesamtintensität und der Geometrie des Bildes ab. Ihr Verhältnis in Form des Parameters

$$W = -10 \log \frac{P_{\text{speckle}}}{P_{\text{structure}}} \quad (3.7)$$

ist jedoch davon unabhängig und kann als Kriterium zur Unterscheidung der Epitheltypen herangezogen werden.

Anwendung und Bewertung

Zu vier Bildern des Ösophagus- und sieben Bildern des Magenepithels (Abbildung 3.31) wurden die Leistungsspektren (Abbildung 3.32) berechnet. Diese wurden azimuthal gemittelt (Abbildung 3.33) und der Parameter W gemäß Gleichung (3.7) bestimmt (Tabelle 3.1).

W übersteigt beim Zylinderepithel nie einen Wert von 15,5 dB, während beim Plattenepithel W im Mittel bei 21,0 dB liegt. Allerdings wird beim Plattenepithel einmal der Wert $W = 15,7$ dB (Speiseröhre 1) erreicht. Das zugehörige Bild (Abbildung 3.31, Ö1) ist aufgrund der erkennbaren Zellanordnung eindeutig als Probe vom Ösophagus identifizierbar. Auf eine Beurteilung der Bilddaten durch den Arzt sollte daher nicht verzichtet werden. Ursache für den vergleichsweise geringen Wert von W liegt darin, daß fast der gesamte Rasterbereich nicht optimal fokussiert ist, wodurch relativ zu den wenigen punktförmigen Reflexionen die in den flächenhaften Strukturmerkmalen übertragene Leistung zu gering ist. Als Konsequenz wären Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Fokussierung wünschenswert.

Bedingt durch die Streuung der Werte für das Plattenepithel muß man einen undefinierten Übergangsbereich zwischen 15 dB und 18 dB ansetzen. Werte darüber dürften

⁵Da die Zellgrenzen im Ösophagus oft, aber nicht immer, eine Vorzugsrichtung haben, ist dies auch der Ortsfrequenzbereich, in dem ein zugehöriges Leistungsspektrum die größte Elliptizität zeigen sollte.

⁶Um das azimuthal gemittelte Leistungsspektrum berechnen zu können, wird vorausgesetzt, daß die Bildpunkte in einem quadratischen Raster mit Bildpunktkantenlänge a liegen. Dann ist die NYQUIST-Frequenz $\nu_{\text{max}} = (2a)^{-1}$. Bei einer Bildgröße von $N_x \times N_y$ Pixel sind die kleinsten darstellbaren Frequenzschritte in Richtung der horizontalen und vertikalen Koordinatenachsen jeweils $\nu_{x\text{min}} = (N_x a)^{-1}$ und $\nu_{y\text{min}} = (N_y a)^{-1}$, und es ergeben sich $\nu_{\text{max}}/\nu_{x\text{min}} = N_x/2$ Frequenzauflösungselemente entlang der x -Achse und entsprechend $N_y/2$ Auflösungselemente für die y -Achse. Eine korrekte Skalierung der Frequenzen entlang der horizontalen und vertikalen Frequenzachse erhält man, wenn man das resultierende Leistungsspektrum auf eine quadratische Größe interpoliert. Der Frequenzabstand der Pixel auf den horizontalen und vertikalen Achsen ist dann $\nu_{\text{min}} = ((\max\{N_x, N_y\}) a)^{-1}$.

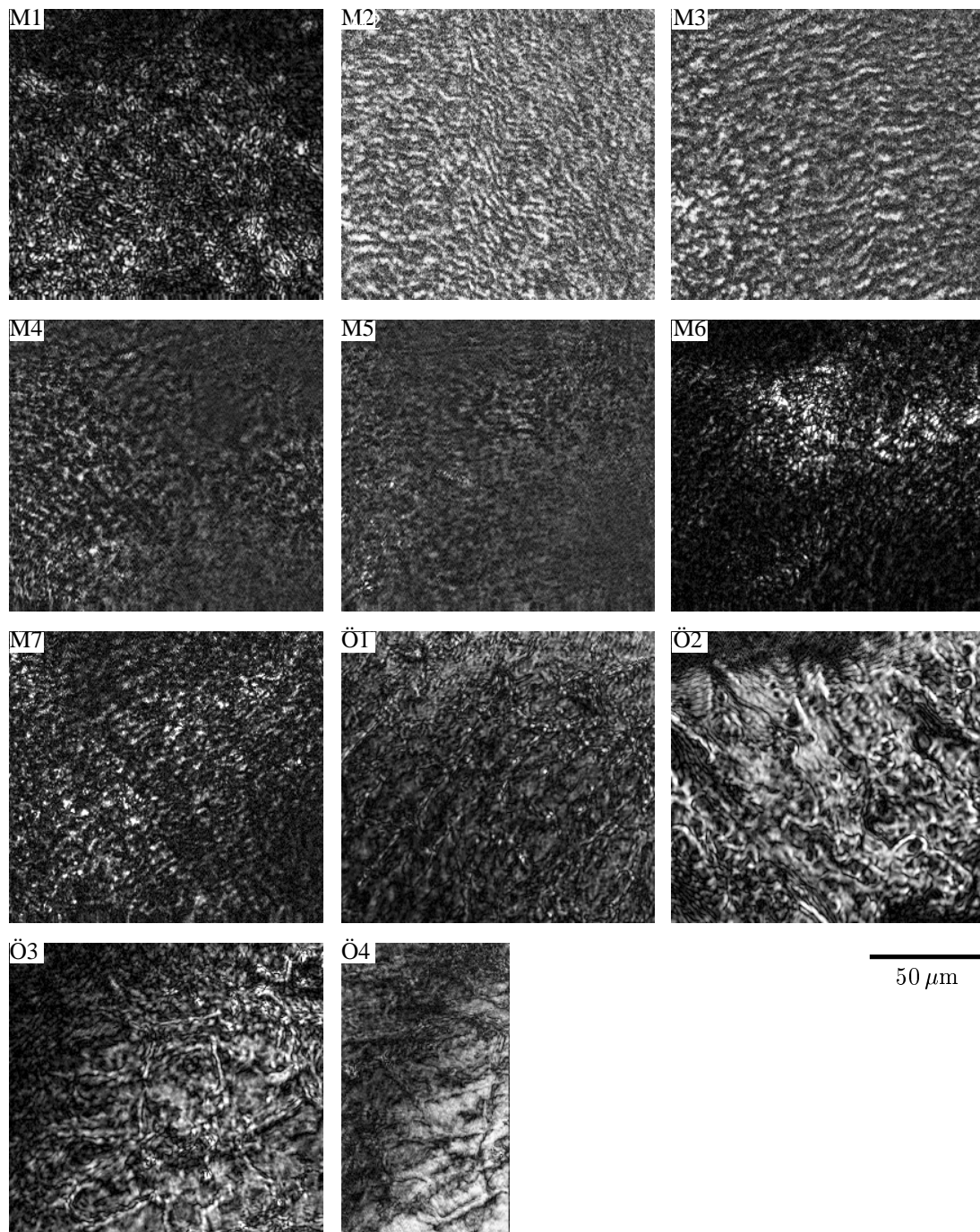


Abbildung 3.31 Ortsraumbilder von Platten- und Zylinderepithel der Ratte. Sie sind die Grundlage für die Frequenzraumanalyse zur Unterscheidung der beiden Epitheltypen. Die Bilder M1 bis M7 zeigen Magenschleimhaut, die Bilder Ö1 bis Ö4 Ösophagusepithel.

eindeutig dem Plattenepithel zugeordnet werden, und an einer entsprechenden Stelle bräuchte bei der BARRETT-Diagnose keine Biopsie entnommen zu werden. Eine solche Vorgehensweise würde somit gezielteres Biopsieren erlauben. Eine genauere Festsetzung des Grenzwertes macht eine Untersuchung mit einer größeren Anzahl aus-

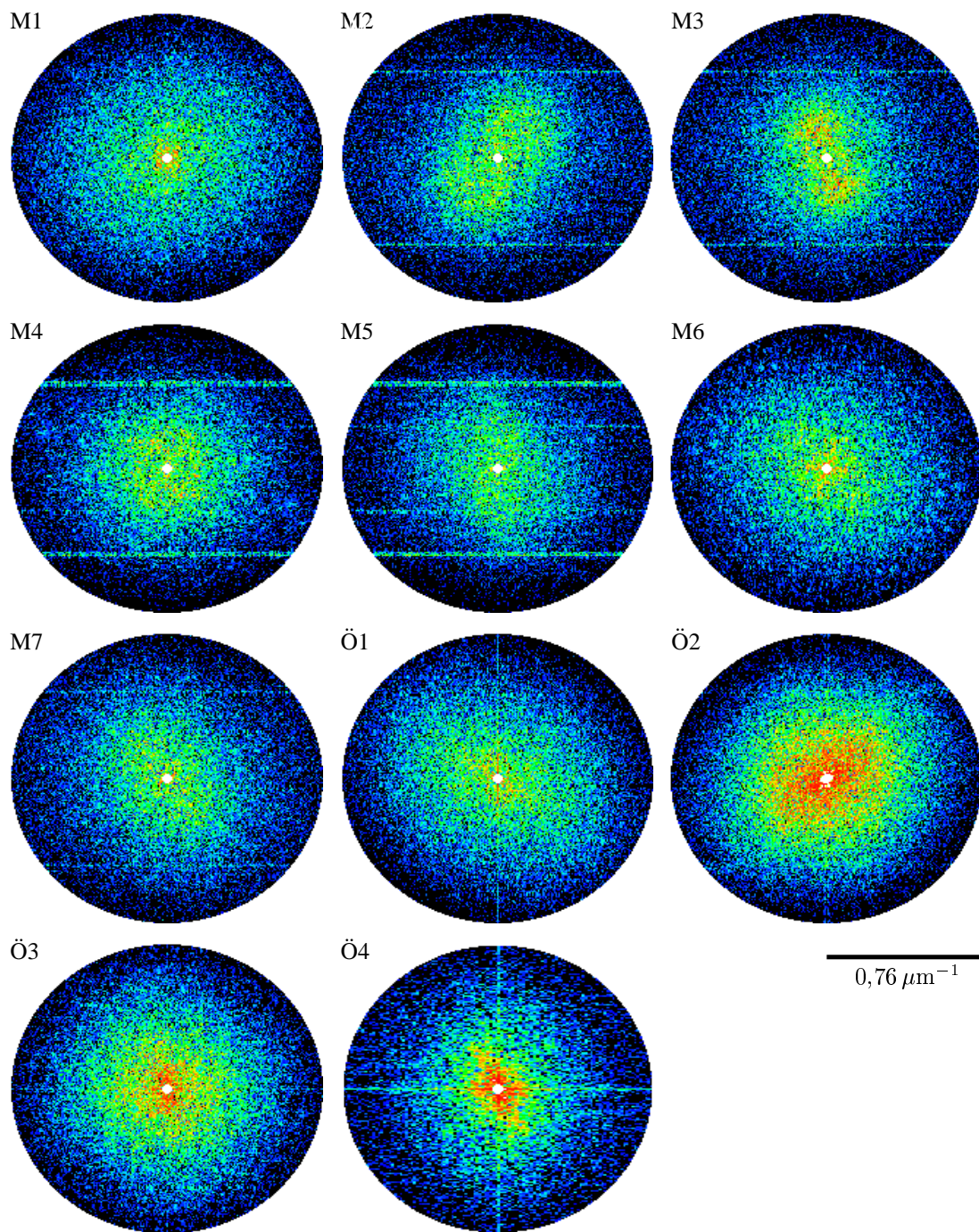


Abbildung 3.32 Leistungsspektren der Ortsraumbilder von Platten- und Zylinderepithel (Abbildung 3.31). Die Normierung (Abbildung 3.33) ist für alle Spektren gleich. Bei den Spektren Ö2 bis Ö4 des Plattenepithels treten die zentrumsnahen, niedrigen Frequenzen verstärkt auf.

wertbarer Bilder erforderlich.

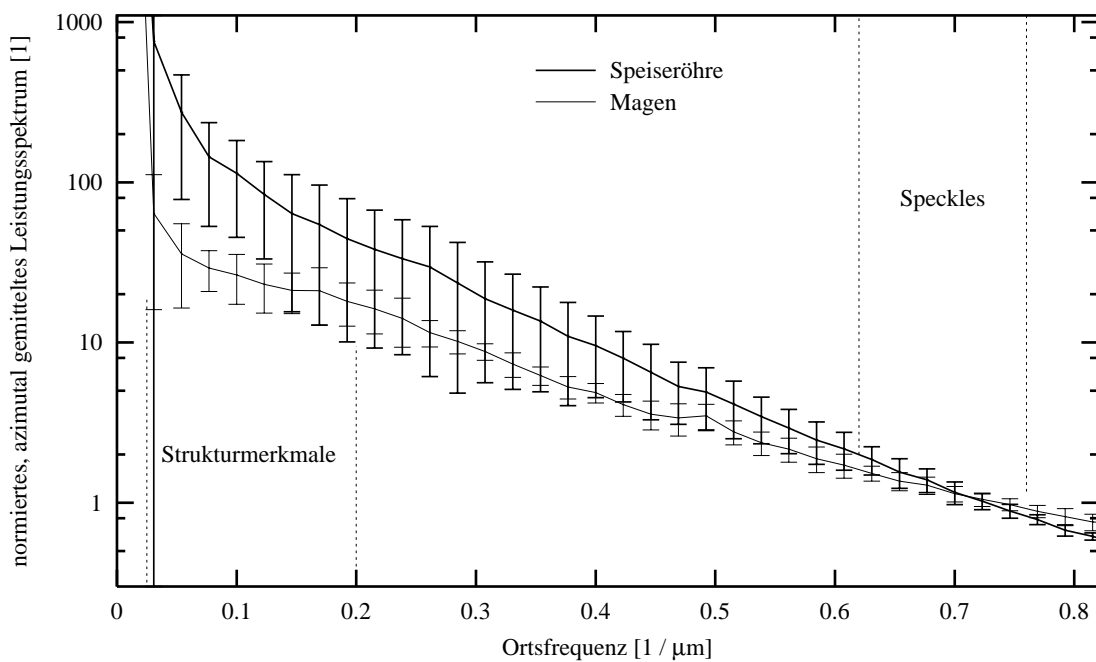


Abbildung 3.33 Mittlere azimuthal gemittelte Leistungsspektren für Ösophagus und Magen (George u. a. 2002). Zu ihrer Berechnung wurden die Leistungsspektren (Abbildung 3.32) azimuthal gemittelt und auf die in den Speckles übertragene Leistung P_{speckle} normiert. Diese wurden in die Gruppen Ösophagus und Magen separiert und aus jeder Gruppe jeweils Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Die beim Plattenepithel ausgeprägtere Übertragung der im niedrigen Ortsfrequenzbereich liegenden Strukturmerkmale ist deutlich erkennbar.

Probe	$P_{\text{structure}}$ [1]	P_{speckle} [1]	$\frac{P_{\text{structure}}}{P_{\text{speckle}}}$ [1]	W [dB]		
				10	15	20
Speiseröhre	1	$5,635 \cdot 10^{-5}$	$1,531 \cdot 10^{-6}$	36,8	15,7	24,5
	2	$1,093 \cdot 10^{-4}$	$3,871 \cdot 10^{-7}$	282,5	24,5	24,5
	3	$8,304 \cdot 10^{-5}$	$9,091 \cdot 10^{-7}$	91,4	19,6	24,2
	4	$4,423 \cdot 10^{-4}$	$1,678 \cdot 10^{-6}$	263,6	24,2	24,2
Magen	1	$5,664 \cdot 10^{-5}$	$1,847 \cdot 10^{-6}$	30,7	14,9	15,4
	2	$4,908 \cdot 10^{-6}$	$2,299 \cdot 10^{-7}$	21,3	13,3	15,4
	3	$8,368 \cdot 10^{-6}$	$2,412 \cdot 10^{-7}$	34,7	15,4	15,4
	4	$1,350 \cdot 10^{-5}$	$5,102 \cdot 10^{-7}$	26,5	14,2	15,4
	5	$6,930 \cdot 10^{-6}$	$3,900 \cdot 10^{-7}$	17,8	12,5	15,4
	6	$2,989 \cdot 10^{-5}$	$8,907 \cdot 10^{-7}$	33,6	15,3	15,4
	7	$1,285 \cdot 10^{-5}$	$5,430 \cdot 10^{-7}$	23,7	13,7	15,4

Tabelle 3.1 Berechnung des Parameters W zur Unterscheidung von Platten- und Zylinderepithel aus den in Speckles und Strukturmerkmalen übertragenen Leistungen P_{speckle} und $P_{\text{structure}}$. Grundlage sind die Leistungsspektren (Abbildung 3.32) nach azimuthaler Mittelung.

3.3 Diskussion

Ein optisches Kohärenzmikroskop wurde als Laboraufbau realisiert. Es ist bezüglich der physikalisch-technischen Funktionsprinzipien seiner Komponenten, der Spezifikationen der Lichtquelle und der damit verbundenen axialen Auflösung, der Dynamik und der Aufnahmedauer mit bestehenden Systemen (Izatt u. a. 1996; Hoeling u. a. 2000) vergleichbar. Darüberhinaus enthält es innovative Algorithmen zum Abgleich der Referenzarmlänge und zur Einstellung der Modulationsamplitude. Die Algorithmen arbeiten robust und sind damit wesentliche Bausteine für eine Automatisierung der an sich komplexen Abläufe bei der Bedienung eines optischen Kohärenzmikroskops. Insofern machen sie einen künftigen Einsatz der optischen Kohärenzmikroskopie im medizinischen Umfeld erst denkbar. Einschränkend ist zu erwähnen, daß die Referenzarmlänge bei der optischen Kohärenzmikroskopie prinzipiell nicht auf einfache Weise abgeglichen werden kann, wenn die Probe in lateral-lateralen Ebenen, die in der Größenordnung der Kohärenzlänge defokussiert sind, ein wesentlich höheres Reflexionsvermögen aufweist als in der Bildebene. Um auch oberflächennah einen Abgleich zu ermöglichen, sollte aus diesem Grund ein dem Brechungsindex des Gewebes entsprechendes Immersionsmedium gewählt werden. Dies impliziert die Verwendung von Wasserimmersion und einen ausreichend großen Abstand zwischen der Probenoberfläche und der der Probe zugewandten Grenzfläche des Objektivs. Ohne Wasserimmersion müßte auch der endoluminal natürlich vorhandene, epitheliale Flüssigkeitsfilm umgangen werden (Abbildung 3.22). Die dazu erforderliche Trocknung der Probenoberfläche ist aber zeitlich weder praktikabel noch medizinisch wünschenswert. Folglich ist die bezüglich der optischen Kohärenztomographie vorherrschenden Meinung, man könne entgegen der Praxis des Ultraschalls ohne Immersionsmedium arbeiten (Li u. a. 2000; Jäckle u. a. 2000), zumindest für die oberflächennahe Bildgebung mit dem optischen Kohärenzmikroskop nicht gültig.

Die Definition und Vermessung der abgleichsabhängigen Punktbildfunktion lieferte eine Darstellung, mit der das axiale Abbildungsverhalten des optischen Kohärenzmikroskops, und prinzipiell auch das des optischen Kohärenztomographen, besser erfaßbar wird. Objektabhängige Einflüsse auf das Abbildungsverhalten können damit anschaulich verstanden werden.

Dies schließt neben der Problematik beim Abgleich der Referenzarmlänge insbesondere die Entstehung der Speckles ein, welche aufgrund der Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Licht und Gewebe letztlich nicht geklärt ist (Schmitt und Knüttel 1997). Bei der Unterscheidung zweier Arten von Speckles (Abschnitt 3.2.2), nämlich einerseits der Speckles, die aufgrund der abgleichsabhängigen Punktbildfunktion aus Reflexionen in defokussierten Ebenen entstehen, und andererseits der Speckles, die durch Mehrfachinterferenzen aus Reflexionen innerhalb der Fokusregion erklärt werden können, eröffnet die abgleichsabhängige Punktbildfunktion eine neue Sichtweise auf die Ursachen der Speckles. Ferner könnte abgleichsabhängigen Punktbildfunktion mathematische Modelle für Simulationsprozesse vereinfachen.

Praktisch führt die abgleichsabhängige Punktbildfunktion aber darüberhinaus auf ei-

ne Methode zur Specklereduktion. Nimmt man für verschiedenen Referenzarmlängen, die um die abgegliche Referenzarmlänge variiert werden, mehrere lateral-laterale Bilder auf, so sollten sich die abgleichsabhängigen Speckles aus defokussierten Ebenen stärker ändern als die Anteile von Reflexionen aus der Bildebene. Eine Mittelung sollte daher verstärkt die aufgrund der abgleichsabhängigen Punktbildfunktion aus Reflexionen in defokussierten Ebenen entstandenen Speckles reduzieren. Ob diese Hypothese experimentell Bestand haben wird, hängt auch davon ab, inwiefern die mit der Mittelung einhergehende Kontrastverringering akzeptabel ist. Einen ähnlichen Ansatz für Flüssigkeiten stellt die Verringerung des Einflusses der BROWNSchen Bewegung von Streuzentren durch Mittelung dar (Pan u. a. 1997).

Da beim Reflexionsmikroskop keine durch die abgleichsabhängige Punktbildfunktion bedingten Speckles auftreten (Abschnitt 3.2.2), dürfte oberflächennah der Vorteil der höheren Dynamik des optischen Kohärenzmikroskops den erhöhten apparativen Aufwand gegenüber dem Reflexionsmikroskop nicht rechtfertigen. Dies gilt natürlich nicht, wenn die Speckles zu diagnostischen Zwecken (Abschnitt 3.2.7) ausgewertet werden sollen.

Als Ursache der mutmaßlichen Reduktion von Aberrationen beim optischen Kohärenzmikroskop (Abschnitt 3.2.4) wurde die Selektion eines engen Intervalls optischer Weglängen durch das Kohärenzfilter vermutet. Diese Eigenschaft wäre interessant, um den unvermeidbaren Einfluß von fokusnahen Inhomogenitäten des abzubildenden Zellverbandes auf die Wellenfront zu kompensieren. Sie entbindet aber nicht davon, die Fokusintensität und damit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Beispielsweise können sphärische Aberrationen für einen möglichst großen Tiefenbereich durch die Verwendung von Wasserimmersion vermieden werden (Abbildung 3.13).

Das Kohärenzfilter verändert offenbar die Kohärenzeigenschaften des Systems. Die Kohärenzeigenschaften der Abbildung werden beim auf Monomodenschichtwellenleitern basierenden konfokalen Mikroskop allein durch die zeitliche Kohärenz der Lichtquelle bestimmt (Abschnitt 2.1.2). Dann wäre das Reflexionsmikroskop partiell kohärent, und zwar allein aufgrund der zeitlichen partiellen Kohärenz der Lichtquelle. Die zeitliche Kohärenz wird für das optische Kohärenzmikroskop dagegen durch das Kohärenzfilter erhöht, da durch die Messung der Amplitude der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters nur kohärente Anteile detektiert werden. Die bei der optischen Kohärenzmikroskopie deutlichere Specklebildung stützt diese Sichtweise. Allerdings beobachtet man im lateralen Bild einer Kante keine erhöhte Kohärenz in Form von stärkeren Oszillationen (Abbildung 3.10), wie man sie vom Beugungsbild einer kohärent beleuchteten Kante (Born u. a. 1993; Hecht 1999c) kennt. Dies ist jedoch nur scheinbar ein Widerspruch, denn die Herleitung dieses Beugungsbildes erfolgt unter der Annahme einer flächenhaften Beleuchtung. Bei der optischen Kohärenzmikroskopie aber wird die Kante punktförmig beleuchtet, was unmittelbar mit der räumlichen Kohärenz des verwendeten konfokalen Mikroskops im Zusammenhang steht.

Mittels einer digitalen Tiefpaßfilterung (Abschnitt 3.2.5) können die Speckles in zusammenhängende Strukturen überführt werden. Trotz der damit einhergehenden Reduktion der Auflösung wird der Bildeindruck verbessert, so daß sogar im stark streuen-

den Mageneithel Zellmembranen identifizierbar sind (Abbildung 3.29 *rechts unten*). Jedoch genügt die Auflösung nicht zur Bestimmung wichtiger pathologischer Parameter, wie beispielsweise des Kern-Plasma-Verhältnisses. Daher müssen die Speckles auch optisch reduziert werden. Dies kann durch Verwendung eines Objektivs höherer numerischer Apertur, einer neueren Lichtquelle geringerer Kohärenzlänge (Povazay u. a. 2002) oder dem Übergang zu einer Wellenlänge um 800 nm erfolgen.

Die Auswertung von Volumendatensätzen (Abschnitt 3.2.6) scheint bei einem reflektometrischen Verfahren die Vollständigkeit der Zelldarstellung wesentlich erhöhen zu können (Abbildung 3.30). Dies setzt jedoch eine schnell rasternde Sonde voraus, bei der die axiale Lage der Bildebene und die Länge des Referenzarms präzise kontrolliert werden können. Beobachtungstiefe und Referenzarmlänge sollten auch intuitiv einstellbar sein, um das Objekt leichter erfassen zu können, ähnlich wie die Variation der Bildebene bei der Durchlichtmikroskopie oder der Bewegung eines Ultraschallkopfes. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen der Bildgebung mit Ultraschall und der mit kurzkohärentem Licht dürften, eine schnell rasternde Sonde vorausgesetzt, viele Bildverarbeitungstechniken aus der Sonographie adaptiert werden können.

Die Visualisierung der in den Volumendatensätzen enthaltenen histologischen Information erfordert eine intelligente Datenreduktion mittels digitaler Bildverarbeitung und wäre ein lohnender Gegenstand weiterer Forschung. Die reine Projektion mehrerer Schichten (Abbildung 3.30) wird sich als zu einfach erweisen, während eine Darstellung mittels *Volume Rendering* den Arzt intraoperativ überfordern dürfte. Interessant wäre vielmehr ein Filteralgorithmus, der diskrete Reflexionen auf gekrümmten Flächen, wie sie beispielsweise auf Zellmembranen entstehen, von Specklerauschen unterscheiden kann. Ausgangspunkt hierfür könnte ein dreidimensionales, tiefpaßgefiltertes Bild sein.

Axiale Auflösung und Dynamik sind bei der optischen Kohärenzmikroskopie deutlich besser als bei der Reflexionsmikroskopie. Dadurch ist die axiale Ausdehnung von histologisch interessanten Strukturen oftmals größer als der bei Einsatz des Kohärenzfilters erreichte Schärfentiefenbereich. Dies kann den Bildeindruck bei Betrachtung eines einzigen lateral-lateralen Schnittes im Vergleich zur Reflexionsmikroskopie verschlechtern. Dieser scheinbare Nachteil der optischen Kohärenzmikroskopie läßt sich durch Anpassung der Farbkennlinie kompensieren und kehrt sich bei der Auswertung von Volumendatensätzen in Verbindung mit der höheren Dynamik in einen Vorteil um.

Um Platten- und Zylinderepithel automatisiert unterscheiden zu können, wird die von der lateralen Zelldichte abhängige Neigung zur Specklebildung ausgewertet, wobei eine ausreichend gute Fokussierung der Probenoberfläche vorausgesetzt werden muß (Abschnitt 3.2.7). Dies ist ein erster Schritt in Richtung einer quantifizierbaren Befundung mittels optischer Kohärenzmikroskopie. Konkret könnte dieses Verfahren bei der Suche nach Metaplasien im Ösophagus angewendet werden. Allerdings muß kritisch bemerkt werden, daß von medizinischer Seite die Forderungen bis zu einer Unterscheidung verschiedener Zylinderepithelien reichen, um die BARRETT-Metaplasie von anderen Metaplasien abgrenzen zu können, und um innerhalb einer BARRETT-Metaplasie neoplastische Zustände identifizieren zu können (Anhang C.4). Hierfür dürfte

die Sensitivität des beschriebenen Parameters nicht ausreichen. Vielmehr müßten intrazelluläre Eigenschaften, wie beispielsweise die Kernpolarität oder das Kern-Plasma-Verhältnis analysiert werden, wozu vermutlich die Auswertung von Volumendatensätzen erforderlich würde. Jedoch wird die Aufnahme von Volumendatensätzen aufgrund der Anforderungen an die Sonde mittelfristig sehr aufwendig sein.

An dieser Stelle eröffnet sich ein Spannungsfeld zwischen einem einfachen Werkzeug, welches während eines Eingriffs schnell und unkompliziert einsetzbar ist, und der Quantifizierbarkeit der Diagnose, von der man sich eine intraoperative Qualitätskontrolle zur Kompensation einer gegebenenfalls geringen Erfahrung des Arztes erhofft. Jedoch treffen bislang optische Diagnoseverfahren zur Quantifizierung von Gewebeeigenschaften häufig gerade an den Stellen uneindeutige Aussagen, bei denen auch der erfahrene Arzt nicht ohne Biopsie auskommt. Ferner bezieht der Arzt bei der Befunderhebung auch makroskopische Eigenschaften ein. Insofern sollte eine Auflösungsverbesserung mit der damit einhergehenden Specklerreduktion der Entwicklung komplexer Auswertungsalgorithmen vorgezogen werden.

Die Vermessung der Oberflächentopologie ist bei der optischen Kohärenzmikroskopie in Form einer Isophasendarstellung mit einer Auflösung von $\lambda_0/8$ ohne nennenswerten algorithmischen Aufwand möglich. Der diagnostische Nutzen bei der endoluminalen Mikroskopie bleibt zunächst offen. Allerdings könnte die laterale Dichte der Isophasenlinien oder auch die mit den Harmonischen gegebene Phaseninformation als zusätzliches Kriterium bei der Unterscheidung von Platten- und Zylinderepithel ausgewertet werden, um die Sensitivität zu erhöhen.

Zusammenfassend kann das Potential der optischen Kohärenzmikroskopie im Hinblick auf eine endoluminale Mikroskopie als aussichtsreich, aber noch lange nicht ausgetestet, bezeichnet werden. Voraussetzung für wesentliche Erkenntniszugewinne wird die Verfügbarkeit eines schnell rasternden und endoluminal einsetzbaren optischen Kohärenzmikroskops sein. Neben den methodischen und anwendungsbezogenen Ergebnissen regt dieses Kapitel eine Reihe von Modifikationen (Abschnitt 5.1) des Aufbaus an, die auf die Realisierung eines endoluminal einsetzbaren optischen Kohärenzmikroskops hinführen.

Die optische Kohärenzmikroskopie steht derzeit in Konkurrenz zu der Fluoreszenzmikroskopie mit einem bildgebenden Lichtwellenleiterbündel (Knittel u. a. 2001), für die mittlerweile klinisch einsetzbare Farbstoffe identifiziert wurden (George und Meining 2003). Die Fluoreszenzmikroskopie wird sich aufgrund ihrer einfachen Kopplung mit der flexiblen Endoskopie schneller im klinischen Einsatz etablieren können, allerdings bleibt sie auf die obersten Zellschichten beschränkt und erfordert eine Wartezeit zwischen Färbung und Untersuchung. Insofern ist die Weiterentwicklung reflektometrischer Verfahren gerechtfertigt, wobei die optische Kohärenzmikroskopie der Reflexionsmikroskopie überlegen ist.

Die optische Kohärenzmikroskopie erreicht nicht die Informationstiefe der optischen Kohärenztomographie, weil ein hochauflösendes Objektiv einen begrenzten Arbeitsabstand hat und die Dynamik aufgrund der durch die laterale Rasterbewegung bedingten

Demodulationstechnik geringer ist als bei der optischen Kohärenztomographie. Letztere kann jedoch ohne die Konfokalität lateral nicht die hohen Auflösungen erreichen, die axial durch die Kohärenzlängen moderner Ti:Saphir-Laserquellen gegeben sind. Daher wird die Zukunft der hochauflösenden optischen Kohärenztomographie zwangsläufig in der Verschmelzung der beiden Techniken liegen. Offen bleibt hierbei, ob letztlich die schnelle Rasterrichtung lateral oder axial liegen wird. Bei einer schnellen lateralen Rasterung sind die Geschwindigkeitsanforderungen für die Tiefeneinstellung der Bildebene geringer, während ein schnelles axiales Rastern die einfachere Demodulationstechnik erlaubt und damit eine höhere Dynamik verspricht. Die Integration von optischer Kohärenzmikroskopie und -tomographie würde langfristig *Staging* und *Grading* (Anhang C.2.3), also die Bestimmung von Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad eines Tumors, in einem Gerät verbinden. Sie ist anspruchsvoll, aber langfristig realisierbar und vor allem medizinisch wünschenswert.

Die erwähnte Konkurrenz der endoluminalen Mikroskopieverfahren dürfte sich künftig in ein Nebeneinander verschiedener Technologien in disjunkten Anwendungsfeldern entwickeln. Während die Fluoreszenzmikroskopie die ideale Erweiterung der flexiblen Chromoendoskopie sein kann, liegen die Stärken der Reflektometrie mit kurzkohärentem Licht aufgrund der Sondengröße (Abschnitt 5.2.1) in der starren Endoskopie in den leicht zugänglichen, mit Plattenepithel ausgekleideten Lumina.

Kapitel 4

Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops

Eine rechnerbasierte Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops kann helfen, die Prinzipien der Bildgebung im Kohärenzmikroskop zu analysieren. Denn reale Gewebeproben sind hierzu wegen der unregelmäßigen Anordnung der Zellen und der großen Zahl der Streuzentren zu komplex, und künstliche, fast transparente Teststrukturen mit mehreren Ebenen mit axialen Abständen von wenigen Mikrometern sind nur schwer und nicht beliebig herzustellen. Zudem können bei einer Simulation systematische und statistische Fehler vermieden oder gezielt eingeführt werden.

Eine rechnerbasierte Simulation wird entwickelt und anschließend zur Klärung der Ursache der objektphasenkorrelierten Streifenartefakte (Abschnitt 3.2.2) herangezogen. Anschließend werden weitere Anwendungsmöglichkeiten für die Simulation aufgezeigt und die erzielten Ergebnisse diskutiert.

4.1 Mathematische Beschreibung der Simulation

Die Simulation soll das physikalische Zustandekommen des Signals modellieren, also insbesondere das periodische Detektorsignal als Funktion der Rasterbewegung und dem Probenreflexionsvermögen berechnen und daraus unter Berücksichtigung einer Zeitkonstante durch Demodulation die Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 ableiten.

Einschränkend wird anstelle einer dreidimensionalen konfokalen Punktbildfunktion nur die axiale konfokale Punktbildfunktion berücksichtigt. Die laterale Auflösung kann durch Anpassung des Gewebemodells eingestellt werden (Abschnitt 4.1.2), jedoch bleibt die Berechnung der Interferenz so auf die optische Achse beschränkt. Dadurch werden Speckles nur in einer Dimension, also entlang der optischen Achse, simuliert. Polarisierungseffekte bleiben ebenfalls unberücksichtigt, so auch ein unzureichender Abgleich der Polarisierungen aus Proben- und Referenzarm, der sich primär in einem erhöhten Signaluntergrund äußern würde.

4.1.1 Rasterbereich und Simulation der Bildaufnahme

Das Resultat der Simulation ist ein Bild von $(N_x - 1) \times N_y$ Pixeln mit einer objektseitigen Pixelgröße von $a_x \times a_y$. Dabei seien N_x und N_y ungerade. Das Bildfeld \mathcal{B} und die Menge \mathcal{S} der abgetasteten Bildpunkte sind dann

$$\mathcal{B} = \{ (x_s, y_s) \in \mathbb{R} \times \mathbb{R} \mid |x_s| < a_x N_x/2 \wedge |y_s| < a_y N_y/2 \} \quad \text{und} \quad (4.1)$$

$$\mathcal{S} = \{ (a_x m_x, a_y m_y) \mid (m_x, m_y) \in \mathbb{Z} \times \mathbb{Z} \} \cap \mathcal{B}. \quad (4.2)$$

Es genügt, die Bildaufnahme für eine Bildzeile entlang der schnellen Rasterrichtung x_s zu simulieren. Das Bild wird dann aus den Simulationsergebnissen einzelner Zeilen zusammengesetzt. Die Geschwindigkeit der schnellen Rasterbewegung sei v_x , so daß

$$(x_s(t), y_s) = (v_x t - a_x (N_x - 1)/2, a_y n_y), \quad t \in [0, a_x N_x/v_x] \quad (4.3)$$

als zeitabhängige Rasterposition während der Simulation der durch n_y indizierten Zeile resultiert. Für jede Zeile gibt der Zeitpunkt $t = 0$ den Beginn der Rasterbewegung an. Das Detektorsignal $I(t)$ wird für jede Zeile für das in Gleichung (4.3) angegebene Zeitintervall berechnet, und zwar mit einer zeitlichen Auflösung von $\Delta t = \nu_{\text{mod}}^{-1}/25$.

Zur Berechnung der abgetasteten Beträge der Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 wird eine natürliche Zahl N_{cycles} von Modulationsperioden herangezogen. N_{cycles} ist das gerundete Produkt aus der Modulationsfrequenz ν_{mod} und der Zeitkonstanten τ der simulierten Demodulationselektronik. Das Abtasten eines Bildpunktes zum Zeitpunkt t_0 wird simuliert, indem die Werte des simulierten Detektorsignals $I(t)$ aus dem Zeitintervall $[t_0 - N_{\text{cycles}}/\nu_{\text{mod}}, t_0]$ FOURIERtransformiert und aus dem Ergebnis die Beträge an den Stellen der Frequenzen der Harmonischen ermittelt werden¹.

Folglich ist für die Simulation ein nicht unerheblicher Rechenaufwand erforderlich. Beispielsweise muß bei $v_x = a_x/(N_{\text{cycles}}/\nu_{\text{mod}})$ das Detektorsignal $I(t)$ pro Bildzeile $25 N_x N_{\text{cycles}}$ mal berechnet werden, also 75000 mal für $N_x = 300$ und $N_{\text{cycles}} = 10$.

4.1.2 Gewebemodell

In jedem Bildfeldpunkt $(x_s, y_s) \in \mathcal{B}$ fließt in das Interferenzstreifenmuster die axiale Verteilung des Reflexionsvermögens $R_s(x_s, y_s, z_s)$ ein. Das dreidimensionale Reflexionsvermögen der Probe muß daher bekannt sein, allerdings nicht in allen Dimensionen kontinuierlich. In der langsamen Rasterrichtung y_s genügt eine diskrete Verteilung entsprechend des Abstandes a_y der N_y abgerasterten Linien. Dagegen muß in Richtung der schnellen Rasterrichtung x_s das Reflexionsvermögen mit einer deutlich höheren Auflösung als a_x bekannt sein. Denn das aufgrund der Phasenmodulation periodische Detektorsignal ändert sich während der Rasterbewegung kontinuierlich mit der Objektphaseninformation. In der axialen Richtung z_s muß die Lage der reflektierenden Grenzflächen exakt bekannt sein, um die Interferenz korrekt zu berechnen.

¹Wegen $N_{\text{cycles}} \in \mathbb{N}$ ist $I(t_0 - N_{\text{cycles}}/\nu_{\text{mod}}) \approx I(t_0)$, wodurch Artefakte bei der FOURIERtransformation minimiert werden. Durch eine geeignete Skalierung liegen ν_{mod} und $2\nu_{\text{mod}}$ in genau einem Kanal des diskreten FOURIERSpektrums.

Diese Anforderungen erfüllt ein Gewebemodell, welches aus N_R reflektierenden, sich nicht schneidenden Grenzflächen besteht, deren Reflexionsvermögen und axiale Positionen an allen Stellen $(a_x m_x, a_y m_y)$ aus \mathcal{S} gegeben sind. Genauer sei $R_s(m_x, m_y, i)$ das Reflexionsvermögen und $z_s(m_x, m_y, i)$ die axiale Position der i -ten Grenzfläche. Für eine beliebige Rasterposition $(x_s(t), y_s) \in \mathcal{B} \mid y_s = a_y n_y \wedge n_y \in \mathbb{Z}$ werden das Reflexionsvermögen $R_s^i(t)$ und die axiale Position $z_s^i(t)$ einer Grenzfläche durch lineare Interpolation gemäß

$$R_s^i(t) = R_s(\lfloor x_s(t)/a_x \rfloor, n_y, i) + (x_s(t) \bmod a_x) (R_s(\lceil x_s(t)/a_x \rceil, n_y, i) - R_s(\lfloor x_s(t)/a_x \rfloor, n_y, i)) \quad (4.4)$$

$$z_s^i(t) = z_s(\lfloor x_s(t)/a_x \rfloor, n_y, i) + (z_s(t) \bmod a_x) (z_s(\lceil x_s(t)/a_x \rceil, n_y, i) - z_s(\lfloor x_s(t)/a_x \rfloor, n_y, i)) \quad (4.5)$$

ermittelt. Die axiale Verteilung des Reflexionsvermögens an der Stelle $(x_s(t), y_s)$ ist schließlich

$$R_s(t) = \sum_{i=1}^{N_R} R_s^i(t) \delta(z_s - z_s^i(t)). \quad (4.6)$$

Das Gewebe wird demnach durch zwei $N_x \times N_y \times N_R$ -Matrizen vollständig repräsentiert. Dabei müssen die Pixelkantenlängen a_x und a_y ausreichend klein gewählt werden, damit die NYQUIST-Bedingung sicher erfüllt ist und so die numerisch effiziente lineare Interpolation anwendbar bleibt.

Das Reflexionsvermögen eines mehrschichtigen Objektes kann nur näherungsweise für wenige, schwach reflektierende Grenzflächen zur Berechnung der Interferenz herangezogen werden. Denn auf dem Weg zur i -ten Grenzfläche wird das Licht durch Streuung und Absorption sowie durch die Reflexionen an den $i - 1$ vorangehenden Grenzflächen gemäß Gleichung (1.1) um den Faktor

$$\mathcal{A}^i(t) = \exp(-\mu_t(z_s^i(t) - z_s^1(t))) \prod_{j=1}^{i-1} (1 - R_s^j(t)) \quad (4.7)$$

abgeschwächt. Hierbei wird angenommen, daß die erste Grenzfläche die Gewebeoberfläche ist. Es ist daher sinnvoll, die effektive Reflexionsstärke

$$\mathcal{R}_s^i(t) = \mathcal{A}^i(t) R_s^i(t) \quad (4.8)$$

der i -ten Grenzfläche und die axiale Verteilung der effektiven Reflexionsstärke

$$\mathcal{R}_s(t) = \sum_{i=1}^{N_R} \mathcal{R}_s^i(t) \delta(z_s - z_s^i(t)) \quad (4.9)$$

zu definieren. Zur Steigerung der numerischen Effizienz werden die effektiven Reflexionsstärken $\mathcal{R}_s^i(t)$ analog zu Gleichung (4.4) direkt aus Matrixelementen $\mathcal{R}_s(m_x, m_y, i)$ interpoliert. Die Matrix der effektiven Reflexionsstärke kann unmittelbar aus der Matrix des Reflexionsvermögens berechnet werden. Dies muß für ein gegebenes Gewebemodell nur einmal, und insbesondere nicht während der Simulation, erfolgen.

Da nur die axiale, nicht aber die laterale konfokale Punktbildfunktion simuliert wird, ist die laterale Auflösung allein durch die Pixelgröße $a_x \times a_y$ gegeben, was prinzipiell einer beliebig guten lateralen Auflösung entspricht. Durch Faltung des Gewebemodells mit einer zweidimensionalen GAUSSfunktion kann die laterale Auflösung angepaßt werden. Einfach ist eine solche Operation aber nur für Objekte, die genau senkrecht zur optischen Achse ausgedehnt sind. Sind dagegen für eine Grenzfläche die axialen Koordinaten z_s^i benachbarter Punkte deutlich voneinander verschieden, müssen gegebenenfalls zusätzliche Grenzflächen eingefügt werden.

4.1.3 Spektrale Energieverteilung der Lichtquelle

Die spektrale Leistungsdichte der Lichtquelle wird als Summe

$$S_{\text{src}}(k) = P_{\text{src}} \sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} w^q \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi} \Delta k^q} \exp\left(-\left(2\sqrt{\ln 2} \frac{k - k_0^q}{\Delta k^q}\right)^2\right) \quad (4.10)$$

von N_{src} GAUSSfunktionen synthetisiert, wobei für die Gewichte w^q die Normierung

$$\sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} w^q = 1 \quad (4.11)$$

gelte. Dadurch sollten alle physikalisch sinnvollen spektralen Leistungsdichten modellierbar sein, während gleichzeitig die Simulation wegen der Linearität der FOURIERtransformation analytisch einfach bleibt. Denn analog zu der Definition (2.32) und der Herleitung von Gleichung (2.35) ergibt sich das Interferenzstreifenmuster als

$$p(\Delta z) = \sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} w^q \exp\left(-\left(\frac{2\Delta k^q \Delta z}{4\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right) \cos(2k_0^q \Delta z). \quad (4.12)$$

Die Funktion $p(\Delta z)$ wird in einer Wertetabelle mit einer Δz -Auflösung von 10 nm notiert, woraus sie bei der Simulation zur Berechnung von $I(t)$ durch lineare Interpolation ermittelt wird. Die übliche Betrachtung eines GAUSSförmigen Spektrums (Izatt u. a. 1996) ist mit dem Spezialfall $N_{\text{src}} = 1$ enthalten. Die effektive Wellenlänge $\lambda_{\text{eff}} = 2\pi/k_{\text{eff}}$ ist der spektral gewichtete Mittelwert des Spektrums und ersetzt begrifflich die Zentralwellenlänge $\lambda_0 = 2\pi/k_0$. Da die spektrale Leistungsdichte einer Lichtquelle üblicherweise in der Wellenlängendarstellung

$$S_{\text{src}}(\lambda) = \sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} S^q \exp\left(-\left(2\sqrt{\ln 2} \frac{\lambda - \lambda_0^q}{\Delta \lambda^q}\right)^2\right) \quad (4.13)$$

zur Verfügung steht, ist eine geeignete Transformation der Parameter aus Gleichung (4.13) in die der Gleichung (4.10) hilfreich. Weil sich Wellenzahl und Wellenlänge reziprok zueinander verhalten, können die Gleichungen nicht exakt ineinander transformiert werden. Bei Superlumineszenzdiolenlichtquellen ist $\lambda_0^q/\Delta \lambda^q$ allerdings stets

groß genug, um unter Verwendung der Transformation

$$k_0^q = \frac{2\pi}{\lambda_0^q}, \quad \Delta k^q = 2\pi \frac{\Delta\lambda}{\lambda_0^2 - \Delta\lambda^2/4}, \quad w^q = \frac{S^q \Delta\lambda^q}{\sum_{i=1}^{N_{\text{src}}} S^i \Delta\lambda^i}. \quad (4.14)$$

eine ausreichende Genauigkeit gewährleisten zu können. Gleichung (4.14) gilt wegen $\Delta k = |k_2 - k_1| = 2\pi |\lambda_1 - \lambda_2| / \lambda_1 \lambda_2 = 2\pi \Delta\lambda / (\lambda_0 + \Delta\lambda/2)(\lambda_0 - \Delta\lambda/2)$ und $S^q \sim w^q 2\sqrt{\ln 2} / \sqrt{\pi} \Delta\lambda^q$.

Die vom Hersteller vermessene spektrale Leistungsdichte der experimentell verwendeten Superlumineszenzdiolenlichtquelle (Abschnitt 3.1.1) kann als Summe zweier oder dreier GAUSSfunktionen dargestellt werden (Abbildung 4.1). Dazu wurden die Werte der spektralen Leistungsdichte an mehreren Stellen abgelesen und die Parameter der GAUSSfunktionen durch numerische Anpassung bestimmt. Für das Modell bestehend aus zwei GAUSSfunktionen sind systematische Abweichungen klar erkennbar, und das mittlere Abstandsquadrat der Kurve beträgt $1,4 \cdot 10^{-5}$. Verwendet man drei GAUSSfunktionen, schmiegt sich das Ergebnis deutlich besser an und das mittlere Abstandsquadrat ist $2,7 \cdot 10^{-6}$. Die resultierende Autokorrelationsfunktion (Abbildung 4.2) ist gut mit der experimentell ermittelten (Abbildung 3.3) vergleichbar.

4.1.4 Konfokale axiale Punktbildfunktion

Die konfokale axiale Punktbildfunktion $h_s(z_s)$ wird durch Interpolation basierend auf den Meßdaten eines existierenden Objektivs ermittelt. Ein in den Meßdaten vorhandener Untergrund wird abgezogen, da dieser abhängig von verschiedenen Parametern des Interferometer simuliert werden soll.

Im Detail wird der Untergrund geschätzt als der Mittelwert aller Werte, die kleiner sind als das 1,01-fache des Mittelwertes aus erstem und letztem Wert der Liste der Meßwerte. Nach der Subtraktion des Untergrundes von den Meßdaten erfolgt eine Normierung des Maximalwertes auf 1 und die Verschiebung des Koordinatensystems, so daß an der Stelle des Maximums $z_s = 0$ ist. Das Ergebnis wird zur Ermittlung von $h_s(z_s)$ linear interpoliert.

4.1.5 Mono- und polychromatische Interferenz

Als Grundlage für die Berechnung der zeitabhängigen Detektorintensität $I(t)$ wird zunächst die zeitabhängige Lichtamplitude auf dem Detektor für eine Wellenlänge hergeleitet.

Das Intensitätsverhältnis zwischen Signaluntergrund und Interferenzsignal wird durch das Strahlteilverhältnis, die Reflexionsvermögen in der Probe und beim Referenzarmspiegel, die jeweiligen Verluste in Proben- und Referenzarm sowie durch den Winkel zwischen den Polarisierungen des aus diesen Armen kommenden Lichtes bestimmt. Das Strahlteilverhältnis ξ sei das Verhältnis von Probenarm- zu Gesamtintensität.

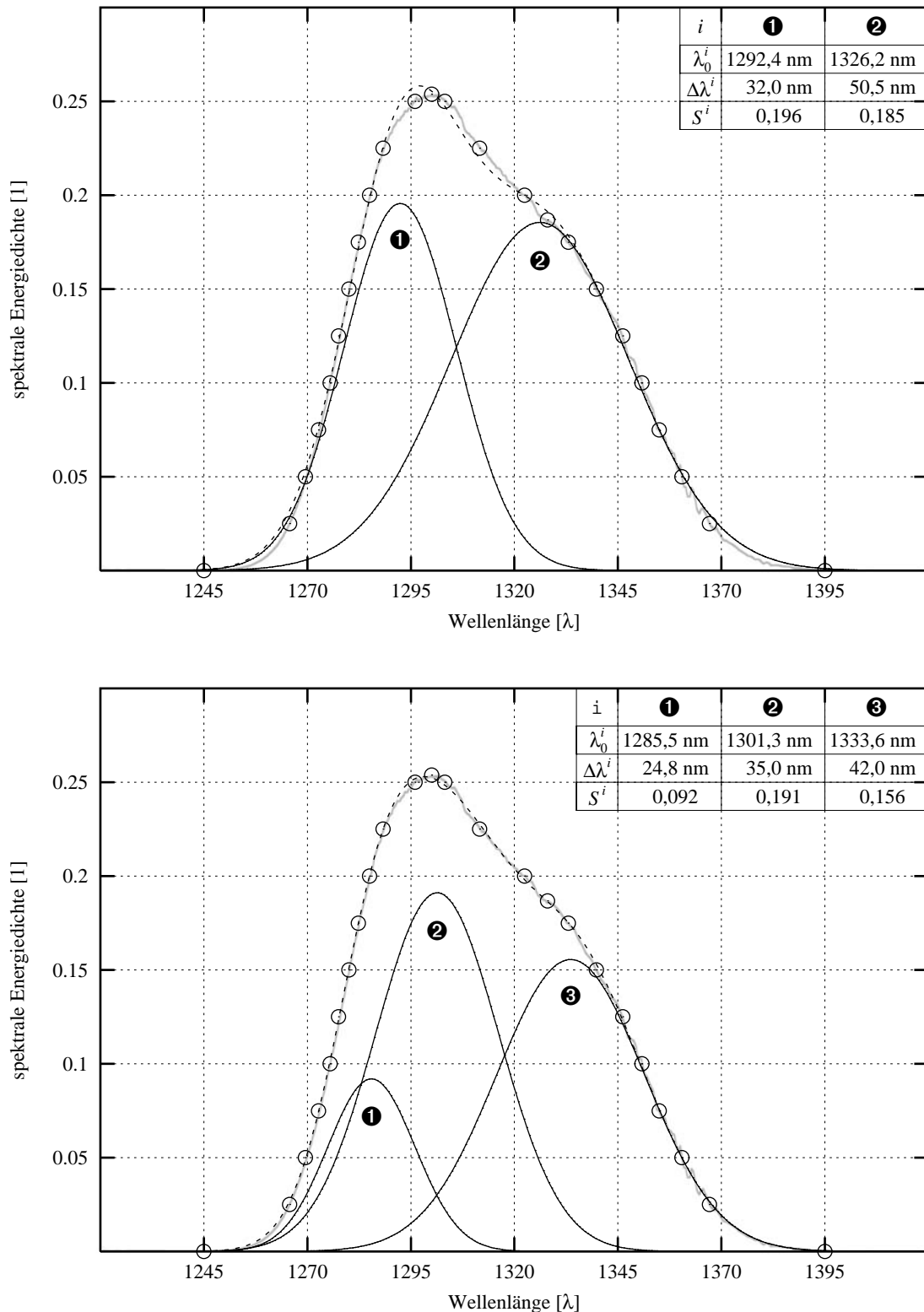


Abbildung 4.1 Die spektrale Leistungsdichte der experimentell verwendeten Breitbandquelle AFC BBS 1310 B-TS lässt sich als Summe von GAUSSfunktionen entsprechend Gleichung (4.13) modellieren. Die graue Kurve ist das digitalisierte Spektrum aus dem der experimentell verwendeten Breitbandquelle beiliegenden Testbericht des Herstellers (AFC Technologies 1998). Die markierten Punkte sind daraus abgelesen und bilden die Grundlage für die numerische Anpassung. *Oben:* Modell mit $N_{\text{SRC}} = 2$. *Unten:* Modell mit $N_{\text{SRC}} = 3$. Die Parameter der GAUSSfunktionen sind oben rechts in den Graphen angegeben.

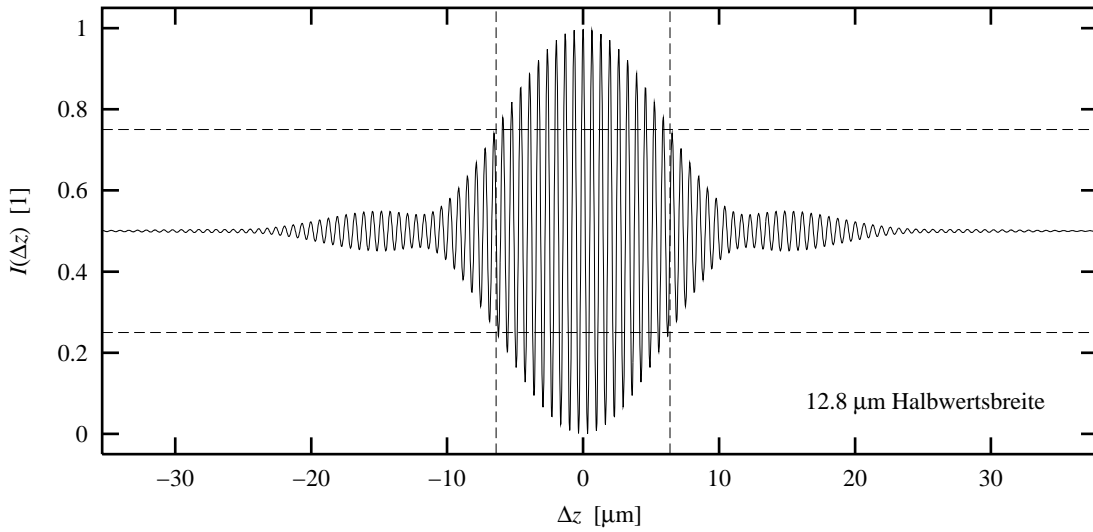


Abbildung 4.2 Autokorrelationsfunktion $I(\Delta z) = \frac{1}{2}(1 + p(\Delta z))$ für die Anpassung der drei GAUSSfunktionen (Abbildung 4.1 unten) an das Spektrum der experimentell verwendeten Lichtquelle AFC BBS 1310B-TS. Ihre Halbwertsbreite und die Form der Nebenmaxima der Einhüllenden sind gut mit dem gemessenen Interferenzstreifenmuster (Abbildung 3.3) vergleichbar.

Verluste durch Streuung, Rückreflexionen an optischen Elementen und vor allem durch die Einkopplung in die Faser werden zusammengefaßt unter dem Parameter der Einkopplungseffizienz ζ_r im Referenz- und ζ_s im Probenarm. Im Referenzarm tritt zu den statischen, durch ζ_r repräsentierten Verlusten noch eine periodische Variation der Intensität aufgrund des phasenmodulierenden Elementes hinzu. Diese Intensitätsmodulation kann im Fall einer mechanischen Phasenmodulation durch eine zeitlich variable Einkopplungseffizienz gegeben sein oder im Fall eines elektrooptischen Modulators durch eine polarisationsbedingte Absorption. Jeder solche Effekt läßt sich durch eine geeignete Justage minimieren und kann unabhängig von seiner physikalischen Ursache mittels einer stetig differenzierbaren Funktion $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ modelliert werden, deren Wertebereich um 1 liegt, so daß schließlich das Produkt $\zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ effektiv eine zeitabhängige Einkopplungseffizienz beschreibt.

Monochromatische Amplituden und Intensitäten an der Stelle des Detektors

Die optische Weglänge $l_r + z_r + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}}t)$ des Referenzarms ist der Abstand der Position des Referenzarmspiegels vom Strahlteiler (Abbildung 2.5). Analog legt l_s die optische Weglänge zwischen der Bildebene des Mikroskopobjektivs und dem Strahlteiler fest. Gleichzeitig ist dies die Koordinate $z_s = 0$ der Verteilung des Reflexionsvermögens im Probenarm. Eine Reflexion an der Stelle z_r des Referenzarms führt an der Stelle z im Detektionsarm zu einer Welle

$$A_{rk}(z, t) = A_0 \xi (\xi - 1) \sqrt{R_r} \zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t) \exp(i(kz - \omega t + 2k(l_r + z_r + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}}t)))) . \quad (4.15)$$

Die Reflexionen im Probenarm erzeugen im Detektionsarm unter Berücksichtigung von Gleichung (4.9) entsprechend die Welle

$$\begin{aligned}
A_{sk}(z, t) &= \int_{-\infty}^{\infty} A_0 (\xi - 1) \xi \sqrt{\mathcal{R}_s(t)} h_s(z_s) \zeta_s \exp(i(kz - \omega t + 2k(l_s + z_s))) dz_s \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} A_0 (\xi - 1) \xi \sqrt{\sum_{i=1}^{N_R} \mathcal{R}_s^i(t) \delta(z_s - z_s^i(t))} h_s(z_s) \zeta_s \\
&\quad \exp(i(kz - \omega t + 2k(l_s + z_s))) dz_s .
\end{aligned} \tag{4.16}$$

Dies läßt sich zu

$$A_{sk}(z, t) = \sum_{i=1}^{N_R} A_{sk}^i(z, t) \tag{4.17}$$

$$\begin{aligned}
A_{sk}^i(z, t) &= A_0 (\xi - 1) \xi \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) \zeta_s \\
&\quad \exp(i(kz - \omega t + 2k(l_s + z_s^i(t))))
\end{aligned} \tag{4.18}$$

vereinfachen². Schließlich ist die monochromatische Gesamtamplitude im Detektionsarm an der Stelle $z = l_d$ des Detektors

$$A_k(t) = A_{rk}(l_d, t) + A_{sk}(l_d, t) . \tag{4.19}$$

Die monochromatische Intensität ergibt sich hieraus unter Einbeziehung von Gleichung (A.28) und unter Verwendung der Abkürzungen

$$I_{rk}(t) = (A_0 \xi (\xi - 1) \sqrt{R_r} \zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t))^2 \tag{4.20}$$

$$\begin{aligned}
I_{rsk}^i(t) &= (A_0 \xi (\xi - 1))^2 \zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t) \zeta_s \sqrt{R_r} \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) \\
&\quad \cos(2k(l_r + z_r + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t) - l_s - z_s^i(t)))
\end{aligned} \tag{4.21}$$

$$I_{sk}^i(t) = (A_0 (\xi - 1) \xi \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) \zeta_s)^2 \tag{4.22}$$

$$\begin{aligned}
I_{sk}^{ij}(t) &= (A_0 (\xi - 1) \xi \zeta_s)^2 \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t) \mathcal{R}_s^j(t)} h_s(z_s^i(t)) h_s(z_s^j(t)) \\
&\quad \cos(2k(z_s^i(t) - z_s^j(t)))
\end{aligned} \tag{4.23}$$

zu

$$\begin{aligned}
I_k(t) &= \langle A_k(t) A_k^*(t) \rangle \\
&= I_{rk}(t) + 2 \sum_{i=1}^{N_R} I_{rsk}^i(t) + \sum_{i=1}^{N_R} I_{sk}^i(t) + 2 \sum_{\substack{i,j=1 \\ i < j}}^{N_R} I_{sk}^{ij}(t) .
\end{aligned} \tag{4.24}$$

²Das Vertauschen von Summation und Integration ist wegen der Eigenschaften der δ -Distribution unter der Annahme $z_s^i \neq z_s^j \quad \forall i, j \in \mathbb{N}$ möglich. Ferner kann $\sqrt{\delta(z_s)}$ wie $\delta(z_s)$ behandelt werden, was mit der Uneindeutigkeit von $\delta(x, \mu)$ bei der Definition der δ -Distribution als Grenzwert $\lim_{\mu \rightarrow \infty} \int_{-\infty}^{\infty} \delta(x, \mu) dx$ (Born u. a. 1993) begründet werden kann.

Polychromatische Intensität an der Stelle des Detektors

Die polychromatische, zeitabhängige Intensität $I(t)$ an der Stelle des Detektors berechnet sich schließlich durch Integration über das Spektrum gemäß Gleichung (2.28). Ausgehend von den Gleichungen (4.20) bis (4.24) ist daher unter Einbeziehung der Gleichungen (4.10), (4.11), (4.12) und (A.43) sowie der Normierung $A_0 = 1$

$$I(t) = I_r(t) + 2 \sum_{i=1}^{N_R} I_{rs}^i(t) + \sum_{i=1}^{N_R} I_s^i(t) + 2 \sum_{\substack{i,j=1 \\ i < j}}^{N_R} I_s^{ij}(t) + I_{\text{bias}} + I_{\text{noise}}(t), \quad (4.25)$$

wobei unter Einführung der Abkürzung

$$\Delta z^i(t) = l_r + z_r - l_s - z_s^i(t) \quad (4.26)$$

die einzelnen Terme durch

$$I_0 = P_{\text{src}} (\xi (\xi - 1))^2 \quad (4.27)$$

$$I_r(t) = I_0 R_r (\zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t))^2 \quad (4.28)$$

$$I_{rs}^i(t) = I_0 \zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t) \zeta_s \sqrt{R_r} \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) p(\Delta z^i(t) + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t)) \quad (4.29)$$

$$I_s^i(t) = I_0 \mathcal{R}_s^i(t) (h_s(z_s^i(t)) \zeta_s)^2 \quad (4.30)$$

$$I_s^{ij}(t) = I_0 \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t) \mathcal{R}_s^j(t)} h_s(z_s^i(t)) h_s(z_s^j(t)) \zeta_s^2 p(z_s^i(t) - z_s^j(t)) \quad (4.31)$$

gegeben sind und I_{bias} einen konstanten Untergrund beschreibt. Der Term $I_{\text{noise}}(t)$ enthält weißes Rauschen eines vorzugebenden Effektivwertes $I_{\text{noise}0}$. In Gleichung (4.25) repräsentiert die Summe der Terme $I_r(t)$ und $I_s^i(t)$ die Intensität bei inkohärenter Überlagerung. Die Interferenz zwischen Proben- und Referenzarm wird durch die Summe der Terme $I_{rs}^i(t)$ beschrieben. In Form der Summe der Terme $I_s^{ij}(t)$ tritt im Vergleich zu Gleichung (2.33) qualitativ die Interferenz zwischen den Grenzflächen innerhalb der Probe hinzu. Diese ändert sich jedoch zeitlich nicht mit der Modulation, weshalb sie für die Bildgebung der optischen Kohärenzmikroskopie theoretisch nicht relevant ist, wohl aber für die der Reflexionsmikroskopie. Insofern dient Gleichung (4.25) auch dem Verständnis der Mehrfachinterferenzen (Abschnitt 3.3), die zur Specklebildung im optischen Kohärenzmikroskop beitragen können. Unter denen der Simulation zugrundeliegenden Voraussetzungen werden Mehrfachinterferenzen ausschließlich durch die Summation der Terme $I_{rs}^i(t)$ mit unterschiedlichen Phasenlagen $2kz_s^i(t)$ verursacht.

4.2 Objektphasenkorreliertes Streifenartefakt

In diesem Abschnitt wird erläutert, wie die rechnerbasierte Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops eingesetzt wurde, um die Ursache der beobachteten objektphasenkorrelierten Streifenartefakte (Abschnitt 3.2.2) zu klären.

4.2.1 Zusammenfassung der Problematik des Streifenartefakts

Die Bildintensität I_{OCM} der optischen Kohärenzmikroskopie wird gemäß Gleichung (2.45) aus den Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 berechnet. Die Summe $\mathcal{H}_1^2 + \mathcal{H}_2^2$ ist proportional zum Reflexionsvermögen der Probe, und die Beiträge der einzelnen Harmonischen hängen von der Phasenlage des Arbeitspunktes der Phasenmodulation auf dem Interferenzstreifenmuster ab. Nimmt bei gleichem Reflexionsvermögen der Beitrag einer Harmonischen zu, so nimmt der der anderen Harmonischen ab (Abbildung 2.9).

Jedoch wurde beobachtet, daß abhängig von der Phasenlage die Harmonischen leicht von den Erwartungen abweichen (Abschnitt 3.2.2, Abbildung 3.22), also insbesondere bei flächigen Objekten Streifen im Bild sichtbar werden. Dieses objektphasenkorrelierte Streifenartefakt ist sehr deutlich bei der optischen Kohärenzmikroskopie von Deckglasunterseiten zu beobachten (Abbildung 4.3). Während sich abhängig von der Bildfeldposition die Objektphase $|2k_0\Delta z|$ um 2π ändert, durchläuft jede Harmonische zwei Maxima und zwei Minima. Die gleichmäßige Abnahme des Abstands der Deckglasunterseite von der Bildebene sollte zu einer gleichmäßigen Zunahme der Maxima führen. Allerdings scheint jedes zweite Maximum zu groß beziehungsweise zu klein zu sein. Dadurch entstehen in der Verteilung von I_{OCM} Streifen, die auch unter einer noch so genauen Anpassung des F -Parameters (Abschnitt 3.1.6, Gleichung (3.4)) nicht zu entfernen sind.

Das Problem fällt demnach besonders bei flächigen Objekten auf. Bei den räumlich schnell fluktuierenden Speckles innerhalb einer Gewebeprobe ist dagegen die resultierende Ungenauigkeit der Reflektometrie, die empirisch weniger als 20% beträgt, tolerabel. Ferner kann sich eine objektphasenabhängige Intensitätsvariation auch positiv auf den subjektiv empfundenen Kontrast des Bildes auswirken.

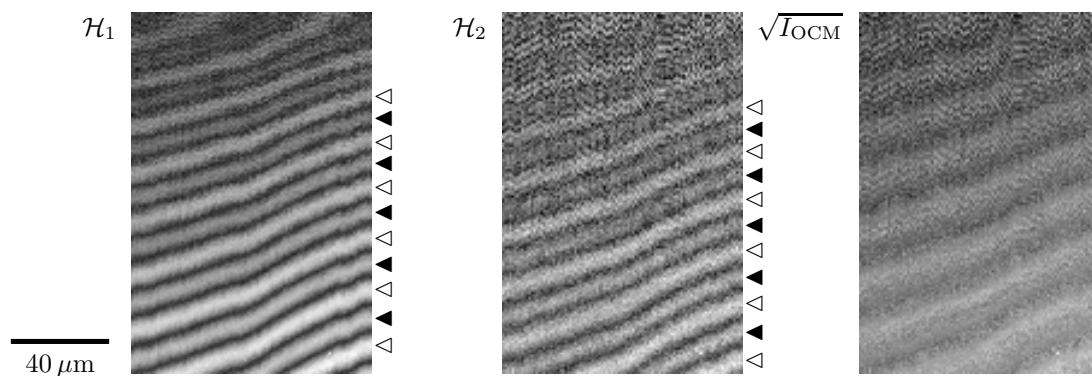


Abbildung 4.3 Extremes Beispiel eines Streifenartefakts bei optischer Kohärenzmikroskopie. Aufgenommen wurde die Unterseite eines Deckglases, also die dem Objektiv abgewandte Oberfläche. Da das Deckglas die Bildebene schneidet, enthalten die Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 jeweils parallele Linien maximaler Intensität. Diese Maxima weisen aber bei jeder Harmonischen abwechselnd überhöhte (\triangleleft) beziehungsweise zu geringe (\blacktriangleleft) Beträge auf, so daß in der Bildintensität $I_{\text{OCM}} = \mathcal{H}_1^2 + \mathcal{H}_2^2$ Streifen verbleiben, die mit dem Verlauf der Harmonischen und damit der Objektphase korreliert sind.

4.2.2 Eingrenzung der Ursache des Streifenartefakts

Die Ursache des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts war zunächst nicht leicht einzugrenzen, da das Artefakt bereits während der Entwicklung des Laboraufbaus zu einem Zeitpunkt beobachtet wurde, als die Charakterisierung der Komponenten (Abschnitt 3.1) noch nicht abgeschlossen war.

Eine Hypothese war, daß die Ausgangssignale der beiden Lock-In-Verstärker zeitlich gegeneinander verschoben sein könnten, da deren digitale Signalprozessoren, Mikroprozessoren und Digital-Analog-Wandler zwischen den beiden Geräten jeweils nicht synchronisiert sind. Eine genauere Analyse zeigte jedoch, daß die Fehler aufgrund der digitalen Signalverarbeitung nicht die beobachteten Streifen hervorrufen können, selbst wenn der Mikroprozessor nicht umgangen wird³.

Weiterhin kam als Ursache für die objektphasenabhängige Verzerrung der Harmonischen eine nicht ideal harmonische Oszillation des Referenzarmspiegels in Betracht. Denn eine harmonische Phasenmodulation ist Voraussetzung für die Gültigkeit der spektralen Zerlegung (2.41) der zeitabhängigen Detektorintensität in Oberfrequenzanteile. Ist die Phasenmodulation nicht harmonisch, so ist die Objektphasenabhängigkeit der Oberfrequenzanteile nicht mehr durch die einfachen Funktionen $\sin \varphi_{\text{mod}}$ oder $\cos \varphi_{\text{mod}}$ gegeben. Insbesondere ist dann nicht zu erwarten, daß für I_{OCM} ein von φ_{mod} unabhängiger Ausdruck gefunden werden kann, wie er mit Gleichung (2.44) gegeben ist. Daher wurde in diesem Zusammenhang die totale harmonische Verzerrung der Spiegelbewegung vermessen und die Halterung des Piezoaktuators verbessert (Abschnitt 3.1.5). Die totale harmonische Verzerrung war jedoch aufgrund des Betriebs in Resonanz stets klein und die Verbesserung der Halterung brachte keine Verringerung der Streifenartefakte mit sich.

Schließlich wurde die Intensitätsmodulation im Referenzarm aufgrund einer justagebedingt zeitabhängigen Einkopplungseffizienz $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ (Abschnitt 4.1.5) als Ursache vermutet. Ihre Auswirkungen auf die Harmonischen sind nicht direkt überschaubar. In jedem Fall hängen sie von der Objektphase und dem Spektrum von $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ ab.

Letztlich könnte das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt auch verfahrensinhärent sein, also dadurch bedingt sein, daß bei der Herleitung von Gleichung (2.44) idealisierte Annahmen gemacht werden. Beispielsweise wird dort der Einfluß der Rasterbewegung nicht berücksichtigt.

Tatsächlich ist die Ursache teilweise verfahrensinhärent, hauptsächlich liegt sie aber in der mit der Phasenmodulation einhergehenden Intensitätsmodulation. Demnach läßt sich das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt durch Justage des Referenzarmspiegels minimieren. Beide Ursachen konnten mittels der Simulation befriedigend nachvollzogen werden.

³Bei Verwendung des internen Mikroprozessors steht am Ausgang jedes Lock-In-Verstärkers eine Zeitkonstante von minimal 5 ms zur Verfügung. Daher wurde der Mikroprozessor im letztlich verwendeten Aufbau stets umgangen (Abschnitt 3.1.3).

4.2.3 Experiment zur Generierung des Streifenartefakts

Vorab wurde das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt für verschieden starke Intensitätsmodulationen $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ mit dem Laboraufbau (Kapitel 3) gemessen.

Die Intensitätsmodulation wurde dabei durch Verkippung der gemeinsamen optischen Achse von Kollimatorlinse und Lichtwellenleiter relativ zu der Normalen des Referenzarmspiegels (Abschnitt 3.1.5) eingeführt. Der Grad der Dejustage wurde bei eingeschalteter Phasenmodulation über den Wechselsignalanteil $I_{\text{rmod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ der Detektorintensität $I(t)$ eingestellt und vermessen. Die Probe blieb dabei deutlich defokussiert, so daß aus dem Probenarm nur die Rückreflexion I_{bias} vom Ende des FC/PC-Steckers detektiert wurde. Dann tritt keine Interferenz auf, und mit Gleichung (4.25) vereinfacht sich $I(t)$ unter Vernachlässigung des Rauschens zu $I(t) = I_{\text{r}}(t) + I_{\text{bias}} = I_0 R_{\text{r}} (\zeta_{\text{r}} \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t))^2 + I_{\text{bias}}$. Daher gilt für den Wechselsignalanteil

$$I_{\text{rmod}}(\omega_{\text{mod}}t) = I_0 R_{\text{r}} \zeta_{\text{r}}^2 (\zeta_{\text{mod}}^2(\omega_{\text{mod}}t) - 1). \quad (4.32)$$

Die Amplitude $I_{\text{rmod}0}$ des Wechselsignalanteils wurde mit einem Oszilloskop beobachtet und vermessen, wobei das Oszilloskop mit dem die Phasenmodulation treibenden Funktionsgenerator synchronisiert war. Bei deutlicher Dejustage läßt sich der beobachtete Wechselsignalanteil durch

$$I_{\text{rmod}}(\omega_{\text{mod}}t) = I_{\text{rmod}0} \sin(\omega_{\text{mod}}t + \varphi_{\zeta}) \quad (4.33)$$

modellieren. Bei Minimierung der Dejustage verschwindet der Wechselsignalanteil im Experiment nicht vollständig. Vielmehr läßt seine Form dann Anteile von Oberfrequenzen der Modulationsfrequenz erkennen. Aufgrund der Gleichungen (4.32) und (4.33) kann die Amplitude $\zeta_{\text{mod}0}^2$ des periodischen Anteils der im Rahmen der Simulation verwendeten Größe

$$\zeta_{\text{mod}}^2(\omega_{\text{mod}}t) = 1 + \zeta_{\text{mod}0}^2 \sin(\omega_{\text{mod}}t + \varphi_{\zeta}) \quad (4.34)$$

aus dem experimentell ermittelbaren Verhältnis

$$\zeta_{\text{mod}0}^2 = I_{\text{rmod}0} / I_0 R_{\text{r}} \zeta_{\text{r}}^2 \quad (4.35)$$

berechnet werden.

Das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt wurde für verschieden starke Intensitätsmodulationen entsprechend der Einstellungen $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0031$, $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0218$ und $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$ aufgenommen (Abbildung 4.4). Hierbei diente als Objekt ein Spiegel, dessen Normale relativ zur optischen Achse derart um die y_s -Achse gedreht war, daß in Richtung der schnellen Rasterrichtung x_s eine lineare Phasenverschiebung vorlag. Die axiale Position wurde derart eingestellt, daß der Fokus innerhalb des Bildfeldes bei hohen x_s -Koordinaten liegt. Die Ausgangsleistung der Lichtquelle betrug 6,0 mW.

Das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt ist für $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0031$ und $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0218$ kaum ausgeprägt, wohingegen es bei $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$ klar erkennbar ist. Am

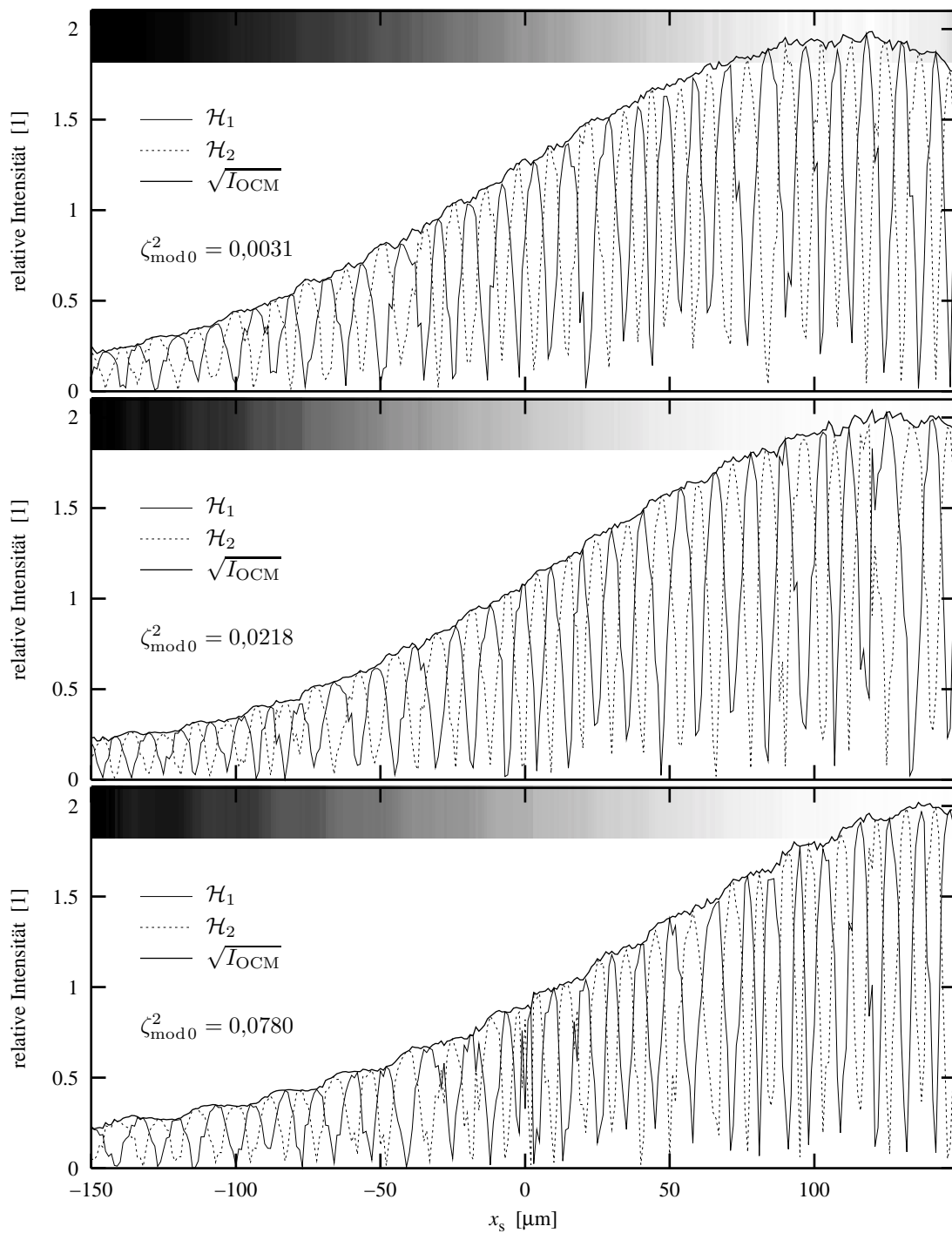


Abbildung 4.4 Messung des objektphasenkorielierten Streifenartefakts mit dem Laboraufbau für verschieden starke Amplituden $\zeta_{\text{mod}0}^2$ der Intensitätsmodulation im Referenzarm. Aufgetragen sind die Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 sowie die Wurzel der resultierenden Intensität I_{OCM} für eine Bildzeile entlang der schnellen Rasterrichtung. Das Objekt ist ein planarer Spiegel, der durch eine leichte Verkippung abhängig von der Bildfeldkoordinate x_s unterschiedlich gut fokussiert ist. Die Bildebene wird bei der Koordinaten $100 \mu\text{m} < x_s < 150 \mu\text{m}$ geschnitten. Am oberen Rand jedes Graphen befindet sich jeweils der Verlauf von $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ in Graustufen-darstellung.

deutlichsten tritt es stets bei geringen Intensitäten hervor, also im defokussierten Bereich $x_s < 0$. An der Stelle $x_s \approx -120 \mu\text{m}$ ist die Objektphase $|2k_0\Delta z|$ etwa 19π von der Bildebene entfernt, wie sich durch Abzählen der Maxima der Harmonischen zeigt. Dort beträgt die Amplitude der sich in $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ fortpflanzenden Oszillation 5% für $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0031$ und $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0218$, und 10% für $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$. Dies rechnet sich in einen Kontrast des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts von jeweils 0,07 und 0,11 um.

Die bereits zuvor beobachtete abwechselnde Überhöhung und Absenkung der Maxima der Harmonischen (Abbildung 4.3) deutet sich für $x_s < -50 \mu\text{m}$ bei $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0218$ und $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$ auch in der Messung an (Abbildung 4.4). Im Vergleich zu Abbildung 4.3 erscheint das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt aber weniger drastisch. Dies liegt einerseits daran, daß in Abbildung 4.3 ein geringeres Intervall des Wertebereichs der axialen Punktbildfunktion erfaßt ist. Ferner differieren die Reflektivität des Objekts und gegebenenfalls auch die Stärke der Intensitätsmodulation.

4.2.4 Reproduktion des Experiments mittels der Simulation

Die Ergebnisse aus der Messung wurden mittels der Simulation überprüft. Dabei wurden alle Parameter der Simulation an die Situation bei der Messung angepaßt⁴. Grundlage der Interpolation der konfokalen axialen Punktbildfunktion $h_s(z_s)$ waren die Meßdaten des konfokalen Mikroskops des Laboraufbaus (Abbildung 3.7 unten, punktierte Kurve). Die spektrale Energieverteilung bestehend aus drei GAUSSfunktionen (Abbildung 4.1) wurde verwendet. Die Amplitude des Rauschens betrug $I_{\text{noise}0} = 10^{-4} I_0$. Die Verteilung des Reflexionsvermögens des Objekts bestand aus einer einzigen, passend geneigten Oberfläche des Reflexionsvermögens $R_s^1(x_s, y_s) \equiv 0,95$.

Simuliert wurde der Verlauf der Harmonischen \mathcal{H}_1 und \mathcal{H}_2 für eine Bildzeile basierend auf dem Modell aus Gleichung (4.33) für $\varphi_\zeta = 0$. Dies erfolgte jeweils für die im Experiment gemessenen Amplituden $\zeta_{\text{mod}0}^2$ der Intensitätsmodulation im Referenzarm (Abbildungen 4.5 bis 4.7) und zusätzlich für $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0$ (Abbildung 4.8), was dem idealisierten Fall ohne Intensitätsmodulation entspricht.

Im Vergleich zu den Meßergebnissen (Abbildung 4.4) fällt die Intensität $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ bei der Simulation zu negativen x_s -Koordinaten hin etwas stärker ab. Der Gradient der Objektphase stimmt jedoch gut überein. Denn die Position mit einem Objektphasenabstand $|2k_{\text{eff}}\Delta z|$ von 19π von der Bildebene liegt bei $x_s \approx -100 \mu\text{m}$. Dort ist der Kontrast des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts bei $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0031$ zu gering, um abgelesen werden zu können. Bei $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0218$ und bei $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$ beträgt er jeweils 0,13 und 0,38. Damit ist der Kontrast zweimal beziehungsweise dreimal höher als bei der Messung und scheint mit zunehmendem Grad der Dejustage auch stärker anzusteigen.

Der qualitative Verlauf der Harmonischen entspricht jedoch sehr gut den zahlrei-

⁴Hier nicht explizit aufgeführte Parameterwerte entsprechen denen aus der Beschreibung des Laboraufbaus (Abschnitt 3.1).

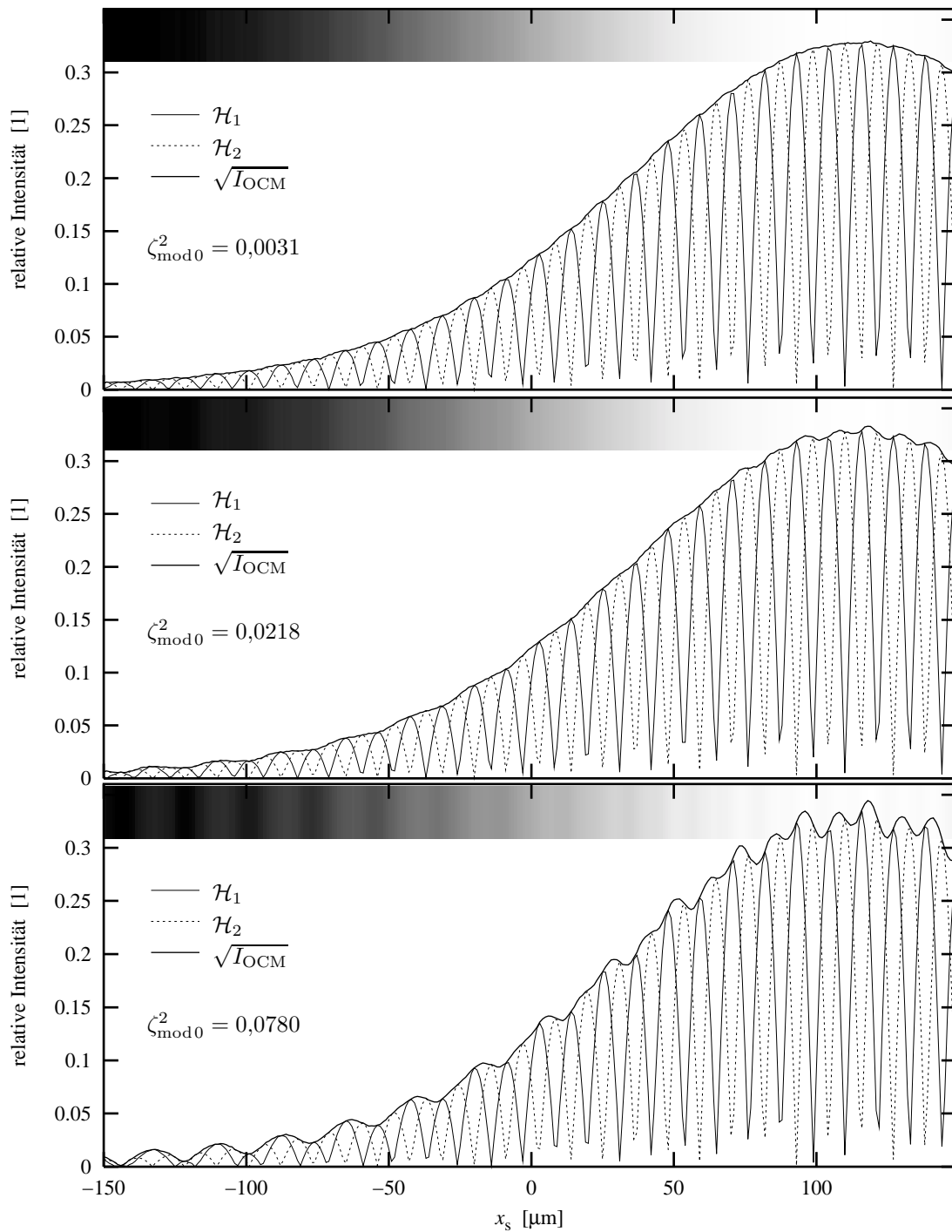


Abbildung 4.5 Simulation des objektphasenkorielierten Streifenartefakts für die drei Amplituden der Intensitätsmodulation im Referenzarm entsprechend den bei der Messung (Abbildung 4.4) zugrundeliegenden Bedingungen.

chen Beobachtungen bei vorangehenden Mikroskopiesitzungen mit dem Laboraufbau. Insbesondere der Umstand, daß selbst unter Anpassung des F -Parameters (Abschnitt 3.1.6) die Streifen nicht zum Verschwinden zu bringen sind. Dies wird da-

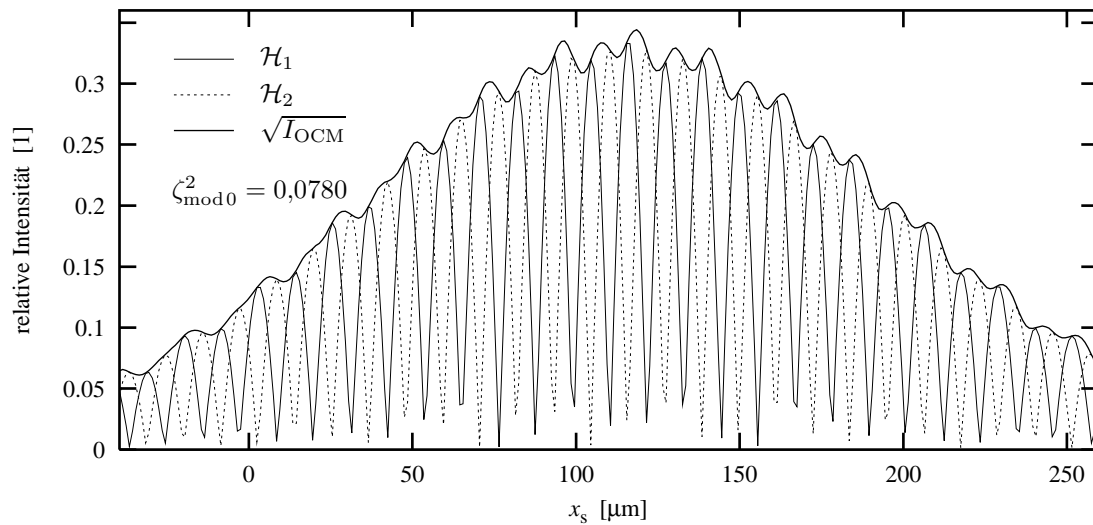


Abbildung 4.6 Simulation für das Objekt aus Abbildung 4.5 für $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$ mit der Bildebene in der Bildmitte. Die Werte der x_s -Koordinate wurden zur besseren Vergleichbarkeit denen der Abbildung 4.5 angepaßt. Das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt ist nicht symmetrisch bezüglich des Maximums der axialen Punktbildfunktion des optischen Kohärenzmikroskops.

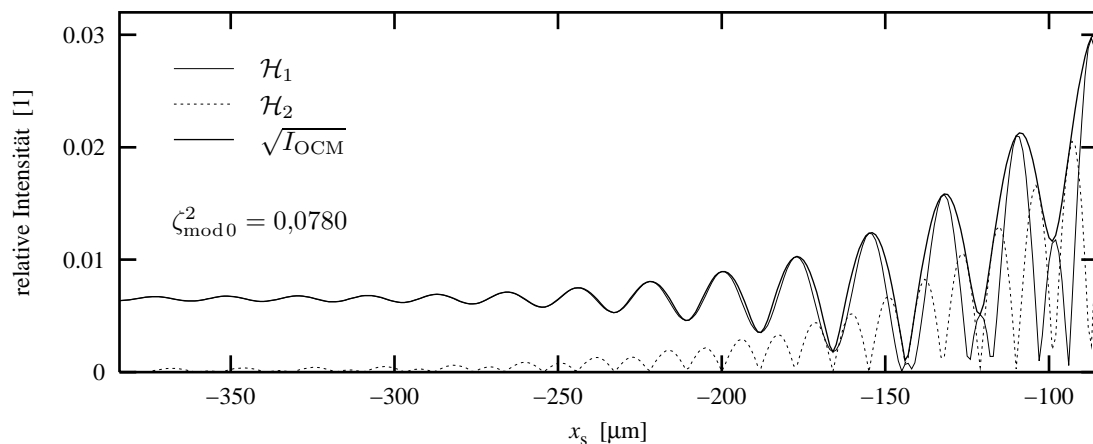


Abbildung 4.7 Simulation für das Objekt aus Abbildung 4.5 für $\zeta_{\text{mod}0}^2 = 0,0780$ bei stärkerer Defokussierung. Die Werte der x_s -Koordinate wurden zur besseren Vergleichbarkeit denen der Abbildung 4.5 angepaßt. Der Kontrast des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts wird bei $x_s \approx -150$ μm maximal und verschwindet für große Defokussierungen.

durch verschärft, daß sich die Form des sich mit einer Objektphasenperiode von 2π wiederholenden Streifensystems kontinuierlich ändert. Es ist auch nicht symmetrisch bezüglich der Bildebene (Abbildung 4.6). Im Vergleich zur Messung fällt auf, daß die Maxima der zweiten Harmonischen \mathcal{H}_2 gleichförmig zur Bildebene hin ansteigen und nur bei der ersten Harmonischen \mathcal{H}_1 die abwechselnde Überhöhung und Absenkung der Maxima auftritt. Das Verhalten der ersten Harmonischen ändert sich jedoch, wenn sich die Objektphase weiter von der Bildebene entfernt (Abbildung 4.7). Bei

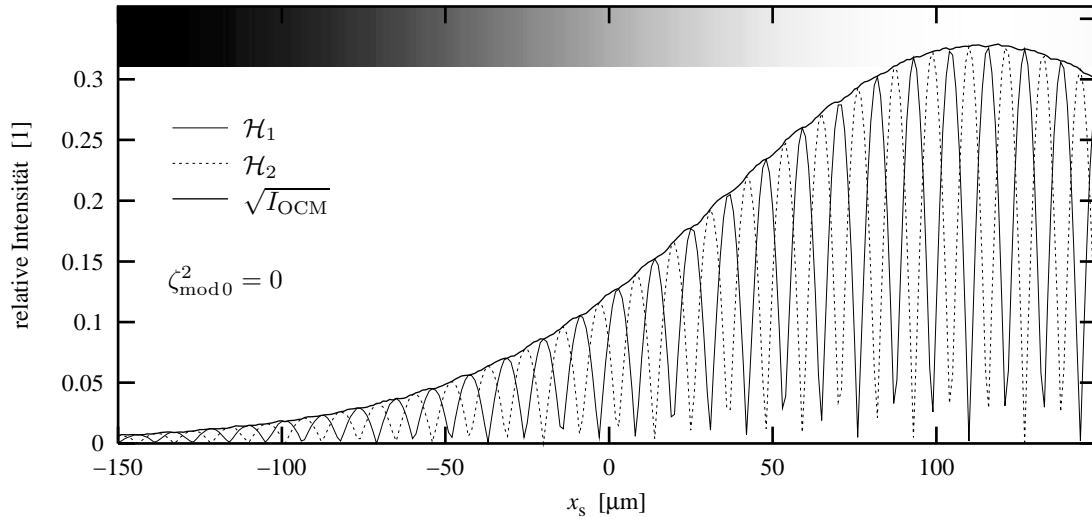


Abbildung 4.8 Simulation für das Objekt aus Abbildung 4.5 bei Abwesenheit der Intensitätsmodulation im Referenzarm. Abgesehen von dem Rauschterm $I_{\text{noise}}(t)$ entspricht dies einer idealen Situation ohne meßtechnische Fehler. Dennoch verbleibt in der resultierenden Intensität $I(t)$ eine geringe Restwelligkeit.

der Stelle $x_s \approx -150 \mu\text{m}$, die einem Objektphasenabstand von $|2k_{\text{eff}}\Delta z| \approx 23\pi$ zur Bildebene entspricht, ist das abgesenkte Maximum so klein, daß es verschwindet. Für $|\Delta z| \rightarrow \infty$ schließlich konvergieren H_1 und $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ zu einer gemeinsamen Konstanten. Der Kontrast des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts wird demnach bei dem Objektphasenabstand $|2k_{\text{eff}}\Delta z| \approx 23\pi$ maximal. Er konvergiert für $|2k_{\text{eff}}\Delta z| \rightarrow 0$ gegen eine Konstante und verschwindet für $|2k_{\text{eff}}\Delta z| \rightarrow \infty$. Die absolute Amplitude der Streifen scheint direkt proportional zu $\sqrt{I_{\text{OCM}}}$ zu sein.

Der Kontrast des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts scheint bei der Simulation im Vergleich zur Messung nicht nur höher zu liegen, sondern mit zunehmender Dejustage auch stärker anzusteigen. Beide Beobachtungen müssen keinen Widerspruch bilden, da sowohl die Phasenlage φ_ζ als auch die Oberfrequenzanteile von $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ bei Messung und Simulation nicht übereinstimmen müssen.

Bei Abwesenheit der Intensitätsmodulation ergibt die Simulation ebenfalls objektphasenabhängige Streifen, die jedoch nur sehr gering ausgeprägt sind (Abbildung 4.8).

4.2.5 Theorie basierend auf Experiment und Simulation

Der Schlüssel zum Verständnis des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts liegt in dem Verhalten der Maxima der einzelnen Harmonischen. Wenngleich die Harmonischen auch durch die Kombination aus der mit der Rasterbewegung verbundenen Änderung der Reflexion aus dem Probenarm und der endlichen Zeitkonstante der Demodulationselektronik beeinflusst werden könnten, lassen sich alle simulierten Streifenartefakte allein als Auswirkungen der Phasen- und Intensitätsmodulation erklären.

Die zeitabhängige Intensität $I(t)$ an der Stelle des Detektors ist durch die Gleichungen (4.25) bis (4.31) gegeben. Die Phasen- und Intensitätsmodulation fließt dabei nur in die Terme $I_r(t)$ und $I_{rs}^i(t)$ ein. Die Summe der bei der Demodulation relevanten Terme schreibt sich daher unter Einbeziehung von Gleichung (4.12) als

$$I_r(t) + 2 \sum_{i=1}^{N_R} I_{rs}^i(t) = K_r \zeta_{\text{mod}}^2(\omega_{\text{mod}} t) + 2 \sum_{i=1}^{N_R} \sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} K_{rs}^{iq}(A_{\text{mod}}, t) \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t) \cos(2k_0^q(\Delta z^i(t) + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t))), \quad (4.36)$$

wobei die Abkürzungen

$$K_r = I_0 R_r \zeta_r^2 \quad (4.37)$$

und

$$K_{rs}^{iq}(A_{\text{mod}}, t) = I_0 \zeta_r \zeta_s \sqrt{R_r} \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) w^q \exp\left(-\left(\frac{2\Delta k^q(\Delta z^i(t) + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t))}{4\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right) \quad (4.38)$$

verwendet wurden. Die Summe der Terme $K_{rs}^{iq}(A_{\text{mod}}, t)$ ist gemäß Gleichung (2.34) proportional zu dem Betrag des komplexen Kohärenzgrads für die durch Lichtquelle und Gewebeprobe gegebene zeitliche Kohärenz. Die in der rechten Seite von Gleichung (4.36) bei einer Oberfrequenz $m\omega_{\text{mod}}/2\pi$ übertragene Leistung definiert den Betrag der jeweiligen Harmonischen \mathcal{H}_m . Wie nachfolgend erläutert wird, können sich die Oberfrequenzanteile der einzelnen Summanden und Faktoren im Zusammenspiel verstärken oder auch gegeneinander abschwächen.

Der Modulationsterm in der Exponentialfunktion von $K_{rs}^{iq}(A_{\text{mod}}, t)$ verursacht das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt, wie es bei Abwesenheit experimenteller Störungen auftritt (Abbildung 4.8). Daher sei für die folgende Betrachtung $\zeta_{\text{mod}}(t) \equiv 1$ angenommen. Der Faktor $K_{rs}^{iq}(0, t)$ beschreibt den zeitlichen Verlauf der aus dem Probenarm zur Detektion gelangenden Leistung für die q -te Komponente der spektralen Leistungsdichte und die i -te Grenzfläche. Er steigt und fällt daher mit der Bildintensität. Die Frequenzanteile, die $K_{rs}^{iq}(A_{\text{mod}}, t)$ zum Zeitpunkt t_0 in die zeitabhängige Detektorintensität $I(t)$ einbringt, hängen sowohl von dem Steigungsverhalten von $K_{rs}^{iq}(0, t)$ in der Umgebung der Stelle t_0 als auch von der Modulationsamplitude A_{mod} ab. Wenn die Änderung der Bildinformation und die Modulationsamplitude klein genug sind, damit das Steigungsverhalten linear genähert werden kann, resultiert eine harmonische Intensitätsmodulation der Frequenz $\omega_{\text{mod}}/2\pi$, deren Amplitude proportional zu

$$A_{\text{mod}} \frac{\partial}{\partial z_s^i} K_{rs}^{iq}(0, t) \quad (4.39)$$

ist. Diese verfahrensinhärente Intensitätsmodulation induziert ein Streifenartefakt mit demselben Wirkungsmechanismus, wie er nachfolgend für die justagebedingte Intensitätsmodulation beschrieben werden wird. Aufgrund des Ausdrucks in Gleichung

(4.39) sollte das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt besonders groß werden können, wenn sich die Bildintensität mit der Objektphase schnell ändert oder die Modulationsamplitude groß ist. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der Simulation (Abbildung 4.8), in dem die Streifen primär an der Flanke im Bereich $-50 \mu\text{m} < x_s < 70 \mu\text{m}$ auftreten. Das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt bleibt auf Reflexionen nahe der Bildebene beschränkt. In der einführenden Darstellung (Abschnitt 2.2.3) entfiel die Betrachtung des verfahrensinhärenten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts, weil bei dem Übergang zu Gleichung (2.37) die von der Rasterbewegung abhängigen Faktoren von $K_{\text{rs}}^{iq}(0, t)$ als konstant genähert wurden.

Das justagebedingte objektphasenkorrelierte Streifenartefakt wird durch die Funktion $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ bedingt, die eine Intensitätsmodulation im Referenzarm modelliert⁵. Die Funktion $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ ist periodisch und kann daher entsprechend

$$\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t) = 1 + \sum_{l=1}^{\infty} a_l \sin(l\omega_{\text{mod}}t + \varphi_{\zeta}^l) \quad (4.40)$$

spektral zerlegt werden. Ebenso existiert mit Gleichung (A.32) eine spektrale Zerlegung der phasenmodulierten Interferenzstreifen $\cos(2k_0^q(\Delta z^i(t) + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}}t)))$ in BESSELFunktionen. Die Multiplikation dieser beiden FOURIERreihen überführt den zweiten Term der rechten Seite von Gleichung (4.36) in eine Summe aus Produkten der Formen

$$K_{\text{rs}}^{iq}(A_{\text{mod}}, t) J_0(2k_0^q A_{\text{mod}}) \cos \varphi_{\text{mod}}^{iq}(t), \quad (4.41)$$

$$K_{\text{rs}}^{iq}(A_{\text{mod}}, t) \times J_m(2k_0^q A_{\text{mod}}) \begin{cases} \cos \varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \cos(m\omega_{\text{mod}}t) & m \text{ gerade} \\ \sin \varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \sin(m\omega_{\text{mod}}t) & m \text{ ungerade} \end{cases}, \quad (4.42)$$

$$a_l \sin(l\omega_{\text{mod}}t + \varphi_{\zeta}^l) K_{\text{rs}}^{iq}(A_{\text{mod}}, t) J_0(2k_0^q A_{\text{mod}}) \cos \varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \quad (4.43)$$

und

$$a_l \sin(l\omega_{\text{mod}}t + \varphi_{\zeta}^l) K_{\text{rs}}^{iq}(A_{\text{mod}}, t) \times J_m(2k_0^q A_{\text{mod}}) \begin{cases} \cos \varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \cos(m\omega_{\text{mod}}t) & m \text{ gerade} \\ \sin \varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \sin(m\omega_{\text{mod}}t) & m \text{ ungerade} \end{cases}. \quad (4.44)$$

Hierbei wurde für die Objektphase der i -ten Grenzfläche und der q -ten Komponente der spektralen Leistungsdichte in Analogie zu Gleichung (2.40) die Abkürzung

$$\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) = 2k_0^q \Delta z^i(t) \quad (4.45)$$

eingeführt. Die Ausdrücke (4.42) bis (4.44) verdeutlichen, daß die Anteile der Oberfrequenzen $m\omega_{\text{mod}}/2\pi$ an der rechten Seite von Gleichung (4.36) – und damit die

⁵Die Intensitätsmodulation kann einerseits justagebedingt sein, aber auch durch nicht perfekte Eigenschaften der Komponenten induziert werden, beispielsweise durch Aberrationen des Kollimators oder Fehler des Kristalls.

Werte der Harmonischen – wesentlich von den Objektphasen $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t)$ und den Phasenlagen φ_{ζ}^l beeinflusst werden. Die Komplexität dieser Abhängigkeiten wird anhand der durch die Gleichungen (A.35) und (A.36) gegebenen FOURIERtransformationen von $\sin(n\omega t + \varphi) \sin(m\omega t)$ und $\sin(n\omega t + \varphi) \cos(m\omega t)$ deutlich, die jeweils vier Seitenbänder aufweisen.

Der erste Term $K_r \zeta_{\text{mod}}^2(\omega_{\text{mod}}t)$ der rechten Seite von Gleichung (4.36) ist objektphasenunabhängig und enthält Anteile bei den Oberfrequenzen $l\omega_{\text{mod}}/2\pi$ mit der jeweiligen Phasenlage von φ_{ζ}^l . Bei Abwesenheit einer Reflexion aus dem Probenarm sind die Beträge der Harmonischen ausschließlich durch Terme dieser Art gegeben. Daher geben dann die Harmonischen das Frequenzspektrum der Intensitätsmodulation wieder.

4.2.6 Erklärung des Simulationsergebnisses mittels der Theorie

Eine weitergehende, analytische Entwicklung der rechten Seite von Gleichung (4.36) dient weder der weiteren Verdeutlichung, noch wäre sie in der Praxis aufgrund der üblicherweise unbekanntenen Phasenlagen φ_{ζ}^l zielführend. Stattdessen werden nun die Überlegungen auf den zuvor simulierten Spezialfall angewendet. Bei diesem war die Funktion $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ durch Gleichung (4.34) für $\varphi_{\zeta} = 0$ gegeben und enthielt außer bei der Frequenz $\omega_{\text{mod}}/2\pi$ keine weiteren Oberfrequenzanteile. Ferner besteht die Probe aus nur einer Grenzfläche, so daß wegen $N_R = 1$ nur die Terme mit $i = 1$ verbleiben.

Das der Simulation zugrundeliegende Modell (4.34) der Funktion $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ ist aus meßtechnischen Gründen⁶ nicht kompatibel mit der allgemeineren Definition (4.40) als FOURIERreihe. Wegen $\zeta_{\text{mod}0} \ll 1$ und $a_l \ll 1$ können jedoch beiden Definitionen mittels $a_1 = \zeta_{\text{mod}0}^2/2$, $\varphi_{\zeta}^1 = \varphi_{\zeta}$ und $a_l = 0 \quad \forall l > 1$ in guter Näherung⁷ ineinander transformiert werden. Nachfolgend wird weiterhin Definition (4.40) zugrundegelegt.

Der Faktor $K_{\text{rs}}^{1q}(A_{\text{mod}}, t)$ wird angesichts des vergleichsweise geringen Einflusses des verfahrensinhärenten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts als $K_{\text{rs}}^{1q}(0, t)$ genähert. Schließlich soll nur erklärt werden, wie es zu der abwechselnden Überhöhung und Absenkung der Maxima der ersten Harmonischen kommt. Daher genügt es, die Harmonischen bei den Objektphasenwerten von $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t)$ zu analysieren, bei denen sie ihr Maximum haben. Dies ist für die geradzahigen Harmonischen unter der Bedingung $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = (\frac{1}{2} \mp \frac{1}{2})\pi$ (Abbildung 2.7 *rechts oben*) der Fall, und für die ungeradzahigen Harmonischen für $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = (1 \mp \frac{1}{2})\pi$ (Abbildung 2.7 *rechts*

⁶Das Modell (4.34) wurde gewählt, weil im Experiment nur die Intensität $\zeta_{\text{mod}0}^2$ gemäß Gleichung (4.35) gemessen werden konnte.

⁷ $(1 + a \sin x)^2 \approx 1 + 2a \sin x \quad \forall |a| \ll 1$

unten). Dann vereinfachen sich die Ausdrücke (4.41) bis (4.44) jeweils zu

$$K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_0(2k_0^q A_{\text{mod}}) \begin{cases} 1 & m \text{ gerade} \\ 0 & m \text{ ungerade} \end{cases}, \quad (4.46)$$

$$\pm K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_m(2k_0^q A_{\text{mod}}) \begin{cases} \cos(m \omega_{\text{mod}} t) & m \text{ gerade} \\ \sin(m \omega_{\text{mod}} t) & m \text{ ungerade} \end{cases}, \quad (4.47)$$

$$\pm a_1 \sin(\omega_{\text{mod}} t + \varphi_\zeta^1) K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_0(2k_0^q A_{\text{mod}}) \begin{cases} 1 & m \text{ gerade} \\ 0 & m \text{ ungerade} \end{cases} \quad (4.48)$$

und

$$\begin{aligned} & \pm a_1 \sin(\omega_{\text{mod}} t + \varphi_\zeta^1) K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) \\ & \times J_m(2k_0^q A_{\text{mod}}) \begin{cases} \cos(m \omega_{\text{mod}} t) & m \text{ gerade} \\ \sin(m \omega_{\text{mod}} t) & m \text{ ungerade} \end{cases}. \end{aligned} \quad (4.49)$$

Der Ausdruck (4.46) stellt bezüglich der Demodulation eine Konstante dar und fließt in keine Harmonische ein. Der Ausdruck (4.48) dagegen trägt objektphasenunabhängig zur ersten Harmonischen bei. Hätte diese keinen Untergrund, so würde der Ausdruck aufgrund seiner Proportionalität zu $K_{\text{rs}}^{1q}(0, t)$ nur eine Skalierung der Harmonischen bewirken, die mittels des F -Parameters leicht korrigiert werden könnte. Er wird daher vernachlässigt. Da $a_1 \ll 1$ angenommen werden kann, stellt der Ausdruck (4.47) den weitaus größten Anteil an den Harmonischen. Er repräsentiert das ideale Demodulationsergebnis gemäß Gleichung (2.42) und beträgt für die erste Harmonische \mathcal{H}_1

$$\mp i\pi K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_1(2k_0^q A_{\text{mod}}) \quad (4.50)$$

und für die zweite Harmonische \mathcal{H}_2

$$\pm \pi K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_2(2k_0^q A_{\text{mod}}). \quad (4.51)$$

Ausdruck (4.49) dagegen ist ein objektphasenabhängiger Störterm, dessen Einfluß auf die Harmonischen deutlich von φ_ζ^1 abhängt und wegen des enthaltenen Faktors a_1 geringer ist. Aufgrund der Gleichungen (A.35) und (A.36) überträgt er nur bei den Frequenzen $\pm(m-1)\omega_{\text{mod}}t/(2\pi)$ und $\pm(m+1)\omega_{\text{mod}}t/(2\pi)$ Leistung. Demnach fließt in die Harmonische \mathcal{H}_1 nur der Ausdruck mit $m=2$ ein, dessen FOURIERtransformierte an der Stelle ω_{mod} durch

$$\pm i\frac{\pi}{2} a_1 K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_2(2k_0^q A_{\text{mod}}) \exp(-i\varphi_\zeta^1) \quad (4.52)$$

gegeben ist. Entsprechend sind für die Harmonische \mathcal{H}_2 nur die Ausdrücke mit $m \in \{1, 3\}$ relevant, für deren Summe die FOURIERtransformierte an der Stelle $2\omega_{\text{mod}}$

$$\mp \frac{\pi}{2} a_1 K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) (J_1(2k_0^q A_{\text{mod}}) \exp(i\varphi_\zeta^1) - J_3(2k_0^q A_{\text{mod}}) \exp(-i\varphi_\zeta^1)) \quad (4.53)$$

beträgt. Der erste Term der rechten Seite von Gleichung (4.36) kann genähert werden als $K_{\text{r}} \zeta_{\text{mod}}^2(\omega_{\text{mod}} t) \approx 1 + 2a_1 \sin(\omega_{\text{mod}} t + \varphi)$. Daher ist sein Beitrag bei der Demodulation auf den Ausdruck $2 K_{\text{r}} a_1 \sin(\omega_{\text{mod}} t + \varphi)$ beschränkt. Mit Gleichung (A.39) ist hiervon die FOURIERtransformierte an der Stelle ω_{mod} gegeben durch

$$- 2i\pi a_1 K_{\text{r}} \exp(i\varphi_\zeta^1). \quad (4.54)$$

An der Stelle $2\omega_{\text{mod}}$ verschwindet die FOURIERtransformierte, so daß der Term keinen Beitrag zur zweiten Harmonischen \mathcal{H}_2 leistet, wie es aufgrund der spektralen Zusammensetzung der Intensitätsmodulation $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ zu erwarten ist.

Die Harmonischen werden in Übereinstimmung mit der Definition (2.42) und der Berechnungsvorschrift bei der Simulation (Abschnitt 4.1.1) als Betrag der FOURIERtransformierten an der Stelle der jeweiligen Oberfrequenz berechnet. Damit ergibt sich nach Zusammenfassen der Gleichungen (4.54), (4.50) und (4.52) die erste Harmonische an denen durch die Bedingung $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = (1 \mp \frac{1}{2})\pi$ gegebenen Stellen der Maxima als

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_1^\pm &\sim 2\pi \left| a_1 K_r \exp(i\varphi_\zeta^1) \right. \\ &\quad \left. \pm \sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) \left(J_1(2k_0^q A_{\text{mod}}) - \frac{a_1}{2} J_2(2k_0^q A_{\text{mod}}) \exp(-i\varphi_\zeta^1) \right) \right|, \end{aligned} \quad (4.55)$$

und durch Zusammenfassen der Gleichungen (4.50) und (4.53) beträgt die zweite Harmonische an denen durch die Bedingung $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = (\frac{1}{2} \mp \frac{1}{2})\pi$ gegebenen Stellen der Maxima

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_2^\pm &\sim 2\pi \sum_{q=1}^{N_{\text{src}}} K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) \left| J_2(2k_0^q A_{\text{mod}}) \right. \\ &\quad \left. - \frac{a_1}{2} (J_1(2k_0^q A_{\text{mod}}) \exp(i\varphi_\zeta^1) - J_3(2k_0^q A_{\text{mod}}) \exp(-i\varphi_\zeta^1)) \right|. \end{aligned} \quad (4.56)$$

Die Differenzen $|\mathcal{H}_1^+ - \mathcal{H}_1^-|$ und $|\mathcal{H}_2^+ - \mathcal{H}_2^-|$ sind ein Maß dafür, wie stark der objektphasenabhängige Störterm auf zwei benachbarte Maxima der jeweiligen Harmonischen wirkt. Bei der ersten Harmonischen bewirkt der objektphasenabhängige Störterm bei zwei benachbarten Maxima jeweils eine Überhöhung und eine Absenkung des Betrags des Maximums. Dagegen wirkt der objektphasenabhängige Störterm bei der zweiten Harmonischen stets in dieselbe Richtung, was zu $\mathcal{H}_2^+ = \mathcal{H}_2^-$ führt. Letzteres liegt daran, daß die Intensitätsmodulation keine Oberfrequenzanteile bei der Frequenz $2\omega_{\text{mod}}/(2\pi)$ aufweist. Folglich beobachtet man übereinstimmend mit der Simulation (Abbildung 4.5) nur in der ersten Harmonischen abwechselnde Überhöhungen und Absenkungen der Maxima.

Der Einfluß des objektphasenabhängigen Störterms auf die Differenzen $|\mathcal{H}_1^+ - \mathcal{H}_1^-|$ und $|\mathcal{H}_2^+ - \mathcal{H}_2^-|$ hängt deutlich von der Phasenlage φ_ζ^1 zwischen Intensitäts- und Phasenmodulation ab. Er wird maximal, wenn in den Gleichungen (4.55) und (4.56) alle Terme reellwertig sind, also wenn mit $\varphi_\zeta^1 \bmod (2\pi) \in \{0, \pi\}$ die Intensitätsmodulation gleich- oder gegenphasig zur Phasenmodulation verläuft. Für $\varphi_\zeta^1 \bmod (2\pi) \in \{\frac{1}{2}\pi, \frac{3}{2}\pi\}$ dagegen verschwindet die Differenz $|\mathcal{H}_1^+ - \mathcal{H}_1^-|$ sogar, und damit prinzipiell auch das justagebedingete, objektphasenkorrelierte Streifenartefakt. Daher ist es kein Widerspruch, daß bei der Simulation das objektphasenabhängige Streifenartefakt sehr viel stärker auftrat (Abbildung 4.5) als im Experiment (Abbildung 4.4), bei dem die Phasenlage zwischen Intensitäts- und Phasenmodulation undefiniert war.

Für die verwendete Lichtquelle kann eine rein GAUSSförmige spektrale Leistungsdichte angenommen werden, ohne die Gültigkeit der folgenden Argumentation einzuschränken. Sei also $N_{\text{src}} = 1$. Ferner war bei der Simulation $\varphi_{\zeta}^1 = 0$, womit sich die Gleichungen (4.55) und (4.56) zu

$$\mathcal{H}_1^{\pm} \approx 2\pi \left| a_1 K_r \pm K_{\text{rs}}^{11}(0, t) \left(J_1(2k_0^1 A_{\text{mod}}) - \frac{a_1}{2} J_2(2k_0^1 A_{\text{mod}}) \right) \right| \quad (4.57)$$

$$\mathcal{H}_2^{\pm} \approx 2\pi K_{\text{rs}}^{11}(0, t) \left| J_2(2k_0^1 A_{\text{mod}}) - \frac{a_1}{2} (J_1(2k_0^1 A_{\text{mod}}) - J_3(2k_0^1 A_{\text{mod}})) \right| \quad (4.58)$$

vereinfachen. Während Gleichung (4.58) nur wiederholt, daß die Maxima der zweiten Harmonischen multiplikativ abgesenkt werden, reflektiert Gleichung (4.57) die Komplexität des simulierten Verlaufs der ersten Harmonischen (Abbildungen 4.6 und 4.7). Für $|x_s| \rightarrow \infty$ dominiert der Term $2a_1 K_r$ als konstanter Untergrund. Der maximale Kontrast des justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts wird unter der Bedingung

$$a_1 K_r = K_{\text{rs}}^{11}(0, t) (J_1(2k_0^1 A_{\text{mod}}) - a_1 J_2(2k_0^1 A_{\text{mod}})/2) \quad (4.59)$$

erreicht, die an der Stelle $x_s \approx -145 \mu\text{m}$ erfüllt ist. Schließlich dominiert in der Nähe der Bildebene der Term $K_{\text{rs}}^{1q}(0, t) J_1(2k_0^q A_{\text{mod}})$, und der Kontrast des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts ist dort proportional zu $2a_1 K_r$.

4.2.7 Anschauliche Begründung des Verhaltens der Maxima

Die abwechselnden Überhöhungen und Absenkungen der Maxima der ersten Harmonischen äußern sich mathematisch durch das wechselnde Vorzeichen in Gleichung (4.57). Ihr Zustandekommen kann aber auch anschaulich begründet werden, wenn man die phasenmodulierte, zeitabhängige Detektorintensität für die beiden relevanten Objektphasenlagen $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = (1 \mp \frac{1}{2})\pi$ als untergrundbehaftete Sinusfunktionen der Form $C(1 \mp b \sin(\omega_{\text{mod}} t))$ vereinfacht⁸. Multipliziert man diese beiden Funktionen jeweils mit der Intensitätsmodulation $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t)$ für $\varphi_{\zeta}^1 = 0$, so resultiert bei $C(1 - b \sin(\omega_{\text{mod}} t))(1 + a_1 \sin(\omega_{\text{mod}} t))$ eine Abschwächung und bei $C(1 + b \sin(\omega_{\text{mod}} t))(1 + a_1 \sin(\omega_{\text{mod}} t))$ eine Verstärkung der bei der Frequenz $\omega_{\text{mod}}/(2\pi)$ übertragenen Leistung.

4.2.8 Ergebnis

Zusammenfassend wird das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt durch zwei Mechanismen hervorgerufen, nämlich einerseits durch die mit der Phasenmodulation einhergehende Verschiebung der Position auf der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters, und andererseits durch eine Modulation der Intensität im Referenzarm, die

⁸Liegt der Arbeitspunkt auf dem Interferenzstreifenmuster bei $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = \frac{1}{2}\pi$, so verläuft die Detektorintensität gegenphasig zur Phasenmodulation (Abbildung 2.7 *rechts unten*). Entsprechend sind für $\varphi_{\text{mod}}^{iq}(t) \bmod (2\pi) = \frac{3}{2}\pi$ Phasenmodulation und Detektorintensität in Phase.

durch den die Phasenmodulation bewirkenden Prozeß hervorgerufen wird. Entsprechend dieser beiden Mechanismen wurden die Begriffe des verfahrensinhärenten und des justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts eingeführt.

In beiden Fällen bedingt die Phasenmodulation faktisch auch eine Intensitätsmodulation. Dabei bestimmen die Beträge und Phasenlagen der Oberfrequenzanteile dieser induzierten Intensitätsmodulation, wie stark die einzelnen Harmonischen beeinflusst und insbesondere deren benachbarte Maxima überhöht oder abgesenkt werden.

Das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt ist bei dem aktuell in der optischen Kohärenzmikroskopie angewendeten Modulationsverfahren (Abschnitt 2.2.3) nicht zu vermeiden. Es ist aufgrund von Gleichung (4.39) umso stärker, je größer die Modulationsamplitude ist und je stärker sich die Bildintensität zeitlich mit der Rasterposition ändert. Indirekt hängt es daher mit der die Halbwertsbreite der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters zusammen, weshalb seine Bedeutung für axial hochauflösende Systeme zunimmt.

Das justagebedingte objektphasenkorrelierte Streifenartefakt läßt sich reduzieren, indem man die durch die Phasenmodulation im Referenzarm induzierte Intensitätsmodulation minimiert. Sein Kontrast wird unter der Bedingung (4.59) maximal, welche stets an einer unabgeglichenen Objektphasenposition erfüllt wird. Daher kann ein defokussiertes, stark reflektierendes Objekt zu deutlichen Streifen (Abbildung 3.22) führen. Charakteristisch ist ferner ein objektunabhängiger Untergrund im Bild des optischen Kohärenzmikroskops, welcher als bedeutsamster Faktor zur Reduzierung der Dynamik der optischen Kohärenzmikroskopie gegenüber der optischen Kohärenztomographie angesehen werden muß.

Bei der für den Laboraufbau (Kapitel 3) durchgeführten Simulation dominierte das justagebedingte das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt.

Sowohl das verfahrensinhärente als auch das justagebedingte objektphasenabhängige Streifenartefakt nimmt mit der Stärke des Reflexionsvermögens R_r des Referenzarmspiegels zu, da R_r in jeden der Faktoren K_r und $K_{rs}^{iq}(A_{\text{mod}}, t)$ einfließt.

4.3 Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Simulation

Das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt war im Gegensatz zu dem justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakt im untersuchten Laboraufbau vernachlässigbar. Bei Systemen mit höherer axialer Auflösung dagegen wird die in Gleichung (4.39) gegebene Ableitung der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters nach der Objektphase größere Werte annehmen. Bei einer hohen numerischen Apertur oder einer sehr breitbandigen Lichtquelle könnte daher das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt auflösungsbegrenzend wirken. Dies würde für die Bandbreite der Lichtquelle oder die numerische Apertur des Objektivs Grenzwerte implizieren, deren Überschreitung bei dem aktuellen Modulationsverfahren (Abschnitt 2.2.3) nicht sinnvoll ist. Diese Grenzen können mit der Simulation bestimmt

werden, wozu sich das bereits verwendete Modell einer ebenen Grenzfläche anbietet.

Ferner würde sich die Simulation dazu eignen, die axiale Auflösbarkeit schwacher Reflexe in der Nähe eines starken Reflexes zu untersuchen.

Es wurde vermutet (Abschnitt 3.3), daß die abgleichsabhängigen Speckles durch Mittelung mehrerer Bilder reduziert werden könnten, wenn diese Bilder bei verschiedenen, um die abgeglichene Referenzarmposition variierende Referenzarmlängen aufgenommen worden wären. Diese Hypothese könnte anhand eines Modells aus zwei oder mehreren Grenzschichten mit Hilfe der Simulation effizient überprüft werden. Auch könnte geklärt werden, für welche Formen der spektralen Leistungsdichte eine solche Art der Specklereduktion besonders wirksam wäre.

4.4 Diskussion

Die entwickelte mathematische Beschreibung der Simulation (Abschnitt 4.1, insbesondere Gleichungen (4.25) bis (4.31)) ist eine Grundlage für das Verständnis der optischen Kohärenzmikroskopie axial ausgedehnter Proben und geht damit deutlich über die eingangs stehende Beschreibung (Abschnitt 2.2) hinaus. Ein ähnlicher Ansatz existiert bereits für die optische Kohärenztomographie (Schmitt und Knüttel 1997), jedoch ist das bei diesem entwickelte Formelwerk nicht unmittelbar auf die Kohärenzmikroskopie mit ihrem aktuell verwendeten Modulationsverfahren übertragbar. Insofern steht nun erstmals eine realistische Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops zur Verfügung. Bei dieser sind die Verteilungen des Reflexionsvermögens der Probe und die spektrale Leistungsdichte der Lichtquelle beliebig modellierbar. Einschränkend wird auf eine dreidimensionale konfokale Punktbildfunktion und auf Polarisations- und Dispersionseffekte verzichtet, wodurch allerdings die Rechenzeiten erträglich bleiben. Durch Implementierung einer axialen Rasterrichtung und Anpassung der Demodulationsfrequenz wäre die Simulation ohne bedeutenden Aufwand auch für Systeme der optischen Kohärenztomographie einsetzbar.

Die Simulation wurde erfolgreich eingesetzt, um die Ursachen des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts zu bestimmen (Abschnitt 4.2). Ausgangspunkt war dabei ein Experiment, dessen Ergebnis mit Hilfe der Simulation nachgebildet wurde. Die Interpretation des Simulationsergebnisses erforderte schließlich extensiven Rückgriff auf die der Simulation zugrundeliegende Gleichungen. Die Simulation des konkreten Beispiels diente demnach als Ausgangspunkt zur Entwicklung der Ansätze einer Theorie des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts. Dies hätte das experimentelle Ergebnis allein nicht leisten können, weil in diesem wesentliche Details des qualitativen Verhaltens der Harmonischen nicht sichtbar waren, was anschließend mittels der entwickelten Theorie auch erklärt werden konnte.

Selbst bei der stärksten angenommenen Amplitude der Intensitätsmodulation wich in der Bildebene die Bildintensität I_{OCM} weder im Experiment noch in der Simulation wesentlich von dem Wert ab, der bei Abwesenheit des objektphasenkorrelierten

Streifenartefakts erreicht worden wäre. Tragen daher primär in der Bildebene liegende Reflexionen zur Bildintensität bei und ist das Objekt nicht flächenhaft, so kann bei optimierter Justage der Einfluß des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts vernachlässigt werden. Dies ist insbesondere innerhalb eines homogenen Zellverbandes der Fall. Mitunter kann das objektphasenkorrelierte Streifenartefakt als leichter Phasenkontrast den subjektiven Bildeindruck sogar aufwerten, was primär für flächenhafte Objekte gilt. Kritisch sind allein starke Reflexionen, die nicht in, aber in der Nähe der Bildebene liegen. Diese sprechen aufgrund des justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts in die Bildintensität über, besonders dann, wenn ihr Abstand von der Bildebene der Bedingung (4.59) für einen maximalen Kontrast des justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts genügt. Besonders anfällig sind hierfür Bildebenen nahe der potentiell stark reflektierenden Gewebeoberfläche. Dies bekräftigt die Forderung nach einer Wasserschicht als Immersionsmedium zwischen Objektiv und Gewebeoberfläche (Abschnitt 3.3). Im Gegensatz zum justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakt zeigt das verfahrensinhärente objektphasenkorrelierte Streifenartefakt kein Übersprechen, weshalb es als gutmütig bezeichnet werden kann, solange die axiale Auflösung nicht zu hoch wird (Abschnitt 4.3).

Das justagebedingte objektphasenkorrelierte Streifenartefakt führt in den einzelnen Harmonischen zu einer Erhöhung des Untergrundes entsprechend des jeweiligen Oberfrequenzanteils in der Intensitätsmodulation $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$. In jeder Harmonischen ist der Untergrund proportional zu der Leistung des aus dem Referenzarm kommenden Lichts, da in die Größe K_r der Faktor R_r einfließt. Dagegen profitiert die zu messende Größe, nämlich die Amplitude der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters, von den Lichtrückflüssen aus Proben- und Referenzarm, da die Größe K_{rs}^{iq} sowohl zu $\sqrt{R_r}$ als auch zu den jeweiligen $\sqrt{R_s^i}$ proportional ist. Verringert man daher die Reflexion aus dem Referenzarm, so erhöht sich die Dynamik, während sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtert. Solange das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wie bei dem verwendeten Laboraufbau (Kapitel 3) ausreichend groß ist, sollte daher die aus dem Referenzarm kommende Leistung reduziert werden.

Bei dem aktuell für die optische Kohärenzmikroskopie verwendeten Modulationsverfahren (Abschnitt 2.2.3) werden zur Berechnung der Bildintensität I_{OCM} gemäß Gleichung (2.44) jeweils zwei Harmonische der aufeinanderfolgenden Ordnungen m und $m + 1$ herangezogen. Ursprünglich wurden hierzu ohne nähere Angabe von Gründen die zweite und die dritte Harmonische verwendet (Izatt u. a. 1996), während hier stets die erste und die zweite Harmonische zur Anwendung kamen, weil in diesen die meiste Leistung übertragen wird (Abschnitt 2.2.3) und daher das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erwarten ist. Ferner wurde bezüglich eines Aufbaus (Hoeling u. a. 2000), der die Phase im Referenzarm ebenfalls mittels eines piezoelektrisch betriebenen Spiegels moduliert, bemerkt, daß die Verwendung der zweiten und dritten Harmonischen gegenüber der ersten und zweiten die Bildqualität verbessert habe (Hoeling 2003). Diese Aussage kann vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Simulation aber nur dann als uneingeschränkt richtig angesehen werden, wenn die Dejustage so stark ist, daß die resultierende Intensitätsmodulation im Referenzarm bei der ersten Harmonischen zu einem deutlich stärkeren Untergrund als bei den übrigen Harmonischen führt. Denn es

wurde bei dem Laboraufbau (Kapitel 3) beobachtet, daß bei optimierter Justage bereits geringe Justageänderungen deutliche Verschiebungen in den relativen Beträgen und Phasenlagen der Oberfrequenzanteile der Intensitätsmodulation hervorrufen. Insbesondere können durchaus Vielfache der Modulationsfrequenz in der Intensitätsmodulationsfunktion $\zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}}t)$ dominieren. Folglich entscheidet bei guter Justage der Frequenzgehalt der Intensitätsmodulation über die zu verwendenden Harmonischen. Sind umgekehrt die Harmonischen bereits gewählt, so legen diese fest, welche Oberfrequenzanteile der Intensitätsmodulation durch leichte Variation der Justage minimiert werden sollten. Es gibt somit bei optimierter Justage keine Präferenz für ein Paar von Harmonischen außer der, daß die Verwendung der ersten und zweiten Harmonischen im Mittel statistisch das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis verspricht. Insofern rechtfertigte die Analyse des justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts nachträglich die Wahl der ersten und zweiten Harmonischen zur Berechnung der Bildintensität.

Solange der instrumentelle Aufwand zur Spektralanalyse nicht dagegen spricht, könnte die Bildintensität auch aus mehreren, geeignet gewichteten Paaren von Harmonischen berechnet werden. Unter welchen Bedingungen dadurch Rauschen und der Einfluß des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts verringert werden könnten, müßte experimentell oder mittels der Simulation bestimmt werden.

Mit der Klärung der Ursachen des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts hat sich der Wert der entwickelten Simulation bei weitem nicht erschöpft. Vielmehr wurden künftige Untersuchungsfelder aufgezeigt (Abschnitt 4.3), aus denen als wichtigstes Ergebnis konkrete Maßnahmen zur Verbesserung der Bildqualität durch Specklerrückbildung zu erwarten sind.

Kapitel 5

Konzeption eines endoluminalen optischen Kohärenzmikroskops

In den beiden vorangehenden Kapiteln 3 und 4 wurde die optische Kohärenzmikroskopie im Hinblick auf ihren möglichen klinischen Nutzen anhand eines Laboraufbaus und einer rechnerbasierten Simulation untersucht. Zu jedem der Kapitel wurden die einzelnen Ergebnisse bereits im Rahmen der Abschnitte 3.3 und 4.4 diskutiert. Nun werden zunächst die Konsequenzen zusammengefaßt, die sich aus diesen Ergebnissen für den Bau eines endoluminal einsetzbaren optischen Kohärenzmikroskops ergeben. Anschließend wird der aktuelle Stand der Umsetzung eines solchen Systems skizziert, welches in Weiterführung der experimentellen Arbeiten zur Zeit aufgebaut wird.

5.1 Konsequenzen für künftige endoluminale Systeme

Um den Laboraufbau (Kapitel 3) in ein klinisch einsetzbares, endoluminales optisches Kohärenzmikroskop zu überführen, sind folgende Weiterentwicklungen obligatorisch:

- Verwendung von Wasserimmersion in Verbindung mit einem hinreichend großen Abstand zwischen der Probenoberfläche und der der Probe zugewandten Grenzfläche der Abbildungsoptik. Der Mindestabstand wird durch die Dämpfung der Nebenmaxima der abgleichsabhängigen axialen Punktbildfunktion bestimmt.
- Piezoelektrische Feineinstellung der Referenzarmlänge, die sowohl rechnergesteuert als auch manuell, beispielsweise über ein Potentiometer, erfolgen kann.
- Konfokale Sonde mit intrakorporaler Rastereinheit, bei der die axiale Lage der Bildebene relativ zur Gewebeprobe präzise kontrolliert werden kann. Der Rastervorgang darf keinen optischen Weglängenunterschied induzieren. Ihr effektiver Durchmesser sollte für einen Einsatz in der flexiblen Endoskopie 10 mm nicht überschreiten, bei bestimmten Anwendungen in der starren Endoskopie wären abhängig von der Sondengeometrie 30 mm tolerabel.

- Bildaufnahmedauer in der Größenordnung von wenigen Sekunden.
- Integration sämtlicher Komponenten mit Ausnahme der Sonde in einem Gehäuse unter Beachtung der Anforderungen an die Schwingungsisolierung.
- Einsatz eines polarisationserhaltenden Lichtwellenleiters im Probenarm, sobald der Monomodentlichtwellenleiter das Gehäuse verlassen hat und damit mechanischen und thermischen Veränderungen ausgesetzt ist.
- Digitale Bildverarbeitung zur Reduktion von Volumendaten, insbesondere ein intelligenter Algorithmus zur Ermittlung und Visualisierung von Zellmembranen.

Optionale Maßnahmen wären:

- Verwendung eines Objektivs höherer numerischer Apertur, einer Lichtquelle geringerer Kohärenzlänge (Povazay u. a. 2002) oder der Übergang zu einer Wellenlänge um 800 nm (Superlumineszenzdiode von Superlum, Rußland) zur Verbesserung der Auflösung. Diese Maßnahmen können jeweils einzeln oder kombiniert eingesetzt werden.
- Dispersionskontrolle im Referenzarm, falls eine Lichtquelle mit deutlich kürzerer Kohärenzlänge als die des Laboraufbaus eingesetzt werden sollte.
- Variables Dämpfungsglied im Referenzarm in Verbindung mit einer anpaßbaren Vorverstärkung des Detektors zur Verringerung des Rauschens (Sorin und Baney 1992) und des justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts sowie zur Optimierung des Signal-zu-Untergrund-Verhältnisses.

5.2 Aktuelle Weiterführung der Entwicklung

Es wurde gezeigt, daß mit einem optischen Kohärenzmikroskop Zellmembranen in stark streuendem Gewebe selbst ohne Auswertung von Volumendatensätzen dargestellt werden können und die Möglichkeit zur automatisierten Epithelunterscheidung besteht. Angesichts des erkennbaren Verbesserungspotentials wurde daher im Anschluß an die in den Kapiteln 3 und 4 dargestellten Arbeiten die Umsetzung der als obligatorisch eingestuften Entwicklungsschritte (Abschnitt 5.1) angegangen, um diese erfolgversprechende Technologie an die klinische Erprobung heranzuführen.

5.2.1 Konfokale Sonde für den endoluminalen Einsatz

Ein Prototyp einer Sonde, deren Eigenschaften die erforderlichen Bandbreiten anderer Komponenten bestimmen, wurde bereits realisiert (George u. a. 2003). Sein effektiver Durchmesser beträgt 25 mm, und optional kann die Probe durch Ansaugen fixiert

und axial positioniert werden. Die Sonde enthält als Rastereinheit einen elektrostatisch betriebenen, in Silizium geätzten Mikroskanner (Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie, Itzehoe) mit einem kardanischn gelagerten Spiegel. Damit wird kein optischer Weglängenunterschied eingeführt und eine Bildrate von 0,5 Hz erreicht. Da sich der Spiegel zwischen Lichtwellenleiterende und einer Einheit aus Kollimator und Objektiv befindet, bleiben die bildfeldabhängigen Aberrationen äußerst gering.

Die kardanische Lagerung erfolgt über zwei Achsen, die orthogonal zueinander stehen. Die den Spiegel unmittelbar haltende Achse wird dabei resonant betrieben. Ihre Resonanzfrequenz kann je nach Entwurf zwischen etwa 200 Hz und 1000 Hz liegen. Damit ist eine Pixelrate von bis zu 1 MHz sinnvoll. Die Bandbreiten der übrigen Komponenten des Systems müssen an diese Pixelrate angepaßt werden.

Aktuell wird zusammen mit einem mittelständischen Hersteller von Endoskopsystemen am Aufbau einer Sonde für die optische Kohärenzmikroskopie gearbeitet, welche ein konventionelles starres Endoskop mit einer verbesserten Version des Prototypen kombiniert. In dieser soll ein kleinerer Mikroskannertyp zum Einsatz kommen, bei welchem die zu Bildfeldverzerrungen führende gegenseitige Beeinflussung der Achsen (George u. a. 2003) reduziert ist. Zudem soll eine Positionsrückmeldung integriert werden, um beide Achsen resonant betreiben zu können. Der effektive Durchmesser sollte sich etwa halbieren.

5.2.2 Elektrooptische Phasenmodulation im Referenzarm

Um angesichts einer Pixelrate von 1 MHz bei der Demodulation einen ausreichenden Rauschabstand zu erhalten, wurde eine Modulationsfrequenz von $\nu_{\text{mod}} = 10$ MHz gewählt. Eine Phasenmodulation dieser Frequenz kann nicht mehr mechanisch erzeugt werden, weshalb ein elektrooptischer Phasenmodulator (Abschnitte B.2.1 und B.2.2) eingesetzt werden wird.

Der Kristall, der zur Phasenmodulation herangezogen werden soll, ist ein 60 mm langer Quader aus Lithiumniobat mit zwei quadratischen Stirnflächen von $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$. Eine Stirnfläche ist zum Lichtein- und austritt antireflexbeschichtet, die andere Stirnfläche ist hochreflektierend beschichtet. Auf jeder der zwei sich gegenüberliegenden Seitenflächen, die senkrecht zur optischen Achse des Kristalls¹ liegen, wurde eine Elektrode aufgebracht, um durch Anlegen einer Spannung den Brechungsindex entlang der optischen Achse des Kristalls zu verändern.

Um eine reine Phasenmodulation ohne Intensitätsmodulation zu erhalten, muß deshalb das in den Kristall eintretende Licht linear in Richtung der optischen Achse des Kristalls polarisiert sein. Um dies zu erreichen, muß im Referenzarm zwischen Kollimator und Kristall ein Polarisator eingebracht werden. Das aus dem Kollimator austretende Licht wird so linear polarisiert, tritt durch die antireflexbeschichtete Stirnfläche in den Kristall ein, durchläuft ihn und wird dabei phasenverzögert, wird an der gegenüberlie-

¹Gemeint ist die kristallographische optische Achse, nicht die optische Achse des Systems aus Kollimator, Polarisator und Kristall.

genden Stirnfläche reflektiert und auf seinem Rückweg durch den Kristall nochmals phasenverzögert.

Um die für die optische Kohärenzmikroskopie erforderliche Phasenmodulation zu erreichen, muß an die Elektroden eine Wechselspannung der Amplitude 147 V und der Frequenz 10 MHz angelegt werden (Abschnitt B.2.3). Dies stellt bei einem quasi-statischen Betrieb eine hohe Leistungsanforderung an den Treiber. Daher wurde ein Schwingkreis für den resonanten Betrieb des Kristalls entworfen (Abschnitt B.2.4), durch den ein Funktionsgenerator als Treiber ausreichen sollte.

Die Reflexion des Lichts an der einen Stirnfläche des Kristalls vereinfacht die Justage von Kristall, Polarisator und Kollimator (Abschnitt B.2.5) erheblich. Die erhöhte Modulationsfrequenz bleibt niedrig genug, um Einflüsse der Laufzeit des Lichts durch den Kristall ebenso vernachlässigen zu können wie das Ausbilden von Seitenbändern im Frequenzspektrum des Lichts (Abschnitt B.2.6).

Für eine Lichtquelle mit ausgeprägtem Polarisationsgrad müssen bei Verwendung eines elektrooptischen Phasenmodulators die Lichtwellenleiter von Proben- und Referenzarm mit einem Polarisations-einsteller versehen werden. Der Polarisations-einsteller im Referenzarm paßt die Polarisationsrichtung der Orientierung des Polarisators vor dem Kristall an, und der Polarisations-einsteller im Probenarm dient der Angleichung der Polarisationszustände des Lichts aus den beiden Armen. In einer solchen Konfiguration könnte das Drehen der Polarisationsrichtung durch den Polarisations-einsteller im Referenzarm zusammen mit einer Analysatorwirkung des Polarisator als variables Dämpfungsglied für die Referenzarmintensität (Abschnitt 5.1) dienen.

Bei einer unpolarisierten Lichtquelle kann auf einen der Polarisations-einsteller verzichtet werden. Dann bewirkt der Polarisator eine 3 dB-Dämpfung der Referenzarmintensität. Diese Argumentation wäre auch angesichts des geringen Polarisationsgrads der Lichtquelle des hier diskutierten Systems (Abschnitt B.1.3) anwendbar.

5.2.3 Detektion, Demodulation und Datenakquisition

Auch die Komponenten für die Detektion des Interferenzsignals, die Demodulation und die Datenakquisition müssen an die erhöhte Modulationsfrequenz $\nu_{\text{mod}} = 10$ MHz angepaßt werden.

Der Detektor (Femto Meßtechnik, kundenspezifisch) verfügt über eine Bandbreite von 90 MHz und wandelt eine Eingangslichtleistung bis 7 mW mit einer Übersetzung von 250 V/W in eine Ausgangsspannung. Damit kann er sowohl zur Messung der Lichtquellenleistung herangezogen werden als auch in Kombination mit dem nachgeschalteten Vorverstärker die bei der Abbildung von Gewebe erwarteten Lichtleistungen bis etwa 1 mW konvertieren.

Der Vorverstärker (Femto Meßtechnik, DHVPA-200) hat eine variable Verstärkung zwischen 10 dB und 60 dB, die auch über eine Schnittstelle ferngesteuert werden kann. Er verfügt über einen mit seinem Eingang parallelschaltbaren Kondensator zur Diffe-

rentiation des Eingangssignals. Der Kondensator sollte vorzugsweise verwendet werden, da die Differentiation den Frequenzgehalt des Signals nicht verändert und der Signaluntergrund entfernt wird.

Die Demodulation zur Gewinnung der ersten und zweiten Harmonischen erfolgt über ein zweikanaliges Modul (Universität Tübingen, Institut für Angewandte Physik, umgesetzt von Herrn Dipl.-Ing. Werner Strohmaier). Jeder Kanal besteht aus einem Bandpaßfilter, dem ein Gleichrichter und ein Tiefpaß zur Glättung nachgeschaltet ist. In einem Kanal beträgt die Mittenfrequenz des Bandpaßfilters ν_{mod} , im anderen Kanal $2\nu_{\text{mod}}$, so daß jeweils die erste oder die zweite Harmonische demoduliert werden. Die Halbwertsbreite der Bandpaßfilter beträgt 1 MHz, was zu einem Gütefaktor Q (Abschnitt B.2.4) von 10 und 20 führt. Damit liegt die Zeitkonstante als Quotient aus Gütefaktor und Mittenfrequenz bei 1 μs . Dies korrespondiert mit der Eckfrequenz des Tiefpaßfilters, die entsprechend der höchsten erwarteten Pixelrate des optischen Kohärenzmikroskops bei 1 MHz liegt.

Die Digitalisierung der Ausgangssignale des Demodulatormoduls mit einer Abtastrate von 1 MHz kann über eine kommerziell erhältliche Datenakquisitionskarte (National Instruments, PCI-6011) erfolgen.

5.3 Diskussion

Ausgehend von den Ergebnissen und Erkenntnissen aus Laborexperiment (Kapitel 3) und Simulation (Kapitel 4) wurden obligatorische und optionale Modifikationen des Laborexperiments erarbeitet, um die vorhandene Technologie in ein im klinischen Rahmen endoluminal einsetzbares optisches Kohärenzmikroskop zu überführen.

Hierbei stellen drei Bausteine eine besondere Herausforderung dar, nämlich die konfokale Sonde, die elektrooptische Phasenmodulation im Referenzarm und die Demodulation des detektierten Interferenzsignals. Bei der konfokalen Sonde ist es aufgrund der dynamischen Eigenschaften der Mikroscannerachsen schwierig, die aufgenommenen Bildpunkte einem kartesischen Raster zuzuordnen². Die Bereitstellung der Steuerung für den elektrooptischen Phasenmodulator und die Abstimmung der Demodulationselektronik sind aufgrund der involvierten hohen Frequenzen technisch sehr anspruchsvoll.

Der aktuelle Fortgang der Arbeiten spricht jedoch für die Tragfähigkeit der vorgeschlagenen Konzeption. Ein Beweis ist der bereits daraus hervorgegangene Prototyp einer Sonde, der nicht unwesentlich dazu beitrug, einen Industriepartner für den Einstieg in die Weiterentwicklung zu gewinnen. Für die Ansteuerung des elektrooptischen Kri-

²Prinzipiell könnte die aus den dynamischen Eigenschaften resultierende Bildfeldverzerrung rechnerisch entfernt werden, wenn zuvor eine Eichmessung mittels einer geeigneten Testprobe durchgeführt wurde. Allerdings ist das dynamische Verhalten nicht zeitstabil, da sich beispielsweise die Resonanzfrequenzen im Laufe von Tagen leicht verschieben können (George u. a. 2003). Insofern wäre eine solche Eichung vor jeder endoskopischen Untersuchung erforderlich und damit nicht praktikabel.

stalls liegt ein konkreter, berechneter Schaltplan (Abbildung B.8) vor, um die erforderliche hochfrequente Wechselspannung mit einem Funktionsgenerator als Spannungsquelle bereitstellen zu können. Hier ist noch offen, ob diese kostensparende Lösung, die zum Betrieb nicht notwendig aber im Bezug auf eine spätere Markteinführung von Bedeutung ist, erfolgreich umgesetzt werden kann. Erste Versuche mit der Schaltung stützen allerdings die gemachten Voraussagen. Das Demodulationsmodul konnte entsprechend den Spezifikationen fehlerfrei aufgebaut werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die erarbeitete Konzeption eines endoluminalen optischen Kohärenzmikroskops zumindest von physikalischer und technischer Seite realisierbar ist.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Kapitel 3 beschreibt, wie ein optisches Kohärenzmikroskop im Labor aufgebaut wurde, eine Charakterisierung seines Abbildungsverhaltens erfolgte, und mit ihm anschließend technische und biologische Proben untersucht wurden. Der Blick war dabei stets auf eine spätere endoluminale Anwendung in der Medizin gerichtet. So basiert das Interferometer auf Lichtwellenleitern, die abgleichsabhängige Punktbildfunktion wurde definiert und vermessen und die mit ihr im Zusammenhang stehenden Phänomene wie Specklebildung und oberflächennahe Bildstörungen erläutert. Dazu gehört auch die erstmalige Beschreibung des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts. Praxisnahe Algorithmen zur Fokussierung, zum Referenzarmabgleich und zur Einstellung der Modulationsamplitude wurden entwickelt und ihre Grenzen aufgezeigt. Schließlich führte die konkrete Bildgebung von gastrointestinalen Gewebeproben auf ein automatisierbares Verfahren zur Epithelunterscheidung. Diesem Erkenntnis- und Erfahrungsgewinn stehen technologische Beschränkungen des Laboraufbaus gegenüber, die es verhinderten, die Wirksamkeit vorgeschlagener Methoden zur Specklereduktion oder Bildverbesserung durch Auswertung dreidimensionaler Datensätze zu überprüfen. In diesem Zusammenhang sind die lange Bildaufnahmedauer in Verbindung mit Bewegungen und Volumenänderungen frisch entnommener Gewebeproben sowie der Referenzarmabgleich über einen Schrittmotor zu nennen.

In Kapitel 4 wurde ein Formalismus zur rechnerbasierten Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops erarbeitet, durch dessen Implementierung die Intensitätsmodulation im Referenzarm als Ursache des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts verifiziert werden konnte. Ausgehend von den Simulationsergebnissen wurde darüberhinaus die Differenzierung zwischen dem verfahrensinhärenten und dem justagebedingten objektphasenkorrelierten Streifenartefakt eingeführt und dazu die theoretischen Grundlagen mit Hilfe des der Simulation zugrundeliegenden Formelwerks geschaffen. Es wurde deutlich, daß ein Teilaspekt des objektphasenkorrelierten Streifenartefakts der wesentliche Einfluß ist, der die Dynamik der optischen Kohärenzmikroskopie beschränkt. Situationsabhängige Maßnahmen zur Minimierung dieser Bildstörung konnten vorgeschlagen werden. Damit steht nun nicht nur erstmals eine rechnerbasierte Simulation eines optischen Kohärenzmikroskops zur Verfügung, sondern es ist auch ein For-

malismus gegeben, mit der künftige Fragestellungen systematischer analysiert werden können. Beispielsweise wurde ein erhöhter Einfluß des verfahrensinhärenten objektphasenkorrelierten Streifenartefakts bei axial hochauflösenden Systemen vorausgesagt, und die Effektivität vorgeschlagener Methoden zur Specklereduktion könnte überprüft werden.

Auf den Ergebnissen der Kapitel 3 und 4 aufbauend wurde in Kapitel 5 eine tragfähige Konzeption eines endoluminalen optischen Kohärenzmikroskops erfolgreich entwickelt. Neben anderen Aufgaben besteht bei einem solchen System die Herausforderung in der Miniaturisierung und der erhöhten Bandbreite. Die Hauptaufgaben sind folglich der Bau einer miniaturisierten, schnell rasternden, konfokalen Sonde, die Implementierung einer elektrooptischen Phasenmodulation im Referenzarm und die Demodulation des hochfrequenten Interferenzsignals. Mit der Umsetzung dieser Aufgaben wurde bereits begonnen, und sie können als lösbar oder gelöst bezeichnet werden. Sie sind mittlerweile vor allem ingenieurstechnischer Natur, weshalb sich die gewählte Vorgehensweise, die Untersuchung der Bildgebung der optischen Kohärenzmikroskopie für die Anwendung im Verdauungstrakt (Kapitel 3) von der Miniaturisierung und Bandbreitenerhöhung (Kapitel 5) zu trennen, als richtig herausgestellt hat. Durch die zu erwartende Bildaufnahmedauer von 2 s oder weniger werden bei einem Einsatz im menschlichen Körper Bewegungsartefakte vermieden und es wird möglich sein, die offenen Fragen aus den Kapiteln 3 und 4, insbesondere die bezüglich der Auswertung von Volumendatensätzen und den vorgeschlagenen Maßnahmen zur Specklereduktion, experimentell zu klären.

Daneben wurde in der Einleitung der Begriff der endoluminalen Mikroskopie definiert (Abschnitt 1.1.1). In Form des Kapitels 2 und Teilen der Einleitung (Abschnitt 1.1.2) werden die für das Verständnis der optischen Kohärenzmikroskopie erforderlichen Grundlagen erstmals vollständig und mit neuen didaktischen Ansätzen zusammengestellt. Die zur Implementierung der Simulation erforderliche Verallgemeinerung (Abschnitt 4.1) erweitert diese Darstellung wesentlich um mehrschichtige Objekte, beliebige Lichtquellspektren und die realistische Simulation von Modulation und Demodulation. Damit liefert diese Arbeit sowohl eine anschauliche Zusammenfassung als auch eine detaillierte theoretische Beschreibung der Bildgebung der optischen Kohärenzmikroskopie für das aktuell verwendete Homodynverfahren.

Nach gut zehn Jahren steht die Bildgebung mit kurzkohärentem Licht im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren der Medizin am Anfang. Dies betrifft sowohl die verwendeten Lichtquellen, die zur Verfügung stehenden Sonden als auch die Techniken der Bildverarbeitung. Ein Vergleich zu der Frühphase der physikalisch verwandten Sonographie liegt nahe: Deutlich erkennbar sind das Potential für technische Verbesserungen und die Notwendigkeit, die medizinische Bedeutung der Bildinformation zu erfassen. Angesichts des Erfolgs der Sonographie stimmt dies optimistisch für die Zukunft der Bildgebung mit kurzkohärentem Licht.

Der Bedarf einer konfokalen Sonde für die endoluminale Bildgebung mit kurzkohärentem Licht wird in der internationalen wissenschaftlichen Gemeinschaft positiv gesehen (Drexler u. a. 1999; Izatt 2001), allerdings konzentrieren sich die technologisch führenden Gruppen auf die optische Kohärenztomographie ohne Ambitionen, konfokale Sonden zu entwickeln und so ernsthaft zu histologischen Aussagen über den mit Zylinderreithel ausgekleideten Verdauungstrakt vorstoßen zu können. Dabei dürfte langfristig die optische Kohärenztomographie mit der optischen Kohärenzmikroskopie verschmelzen. Offen ist dabei lediglich, ob die schnelle Rasterrichtung axial oder lateral liegen wird, also ob die Demodulationstechnik die der optischen Kohärenztomographie oder die der -mikroskopie sein wird. Für die Demodulationstechnik der optischen Kohärenztomographie spricht ihre Einfachheit und die bessere Dynamik, für die der optischen Kohärenzmikroskopie die deutlich geringere Geschwindigkeit, mit der die Bildebene axial durch die Probe bewegt werden müßte. Insofern könnte mittelfristig das hier untersuchte Homodynverfahren von zentraler Bedeutung werden.

Das sich auf der Grundlage dieser Arbeiten in Entwicklung befindliche Endoskop, in welchem ein konventionelles endoskopisches Sichtsystem mit einem Sensor für die optische Kohärenzmikroskopie kombiniert wird, könnte sich zu einer technologischen Plattform zur Integration der optischen Kohärenztomographie entwickeln. Damit wären erstmals Lokalisation, *Staging* und *Grading* (Anhang C.2.3) in einem einzigen Instrument zusammengefaßt.

Zur Zeit haben die vier größten Hersteller von Endoskopiesystemen die künftige Bedeutung der endoluminalen Mikroskopie erkannt und arbeiten im Rahmen von Forschungsprojekten oder gezielten Produktentwicklungen an deren Realisierung. Mit Ausnahme des erwähnten Industriepartners (Abschnitt 5.2.1) scheint deren Interesse ausschließlich in der Fluoreszenz- oder Reflexionsmikroskopie zu liegen, nicht dagegen in der komplizierteren optischen Kohärenzmikroskopie. Mit der Markteinführung erster Geräte werden nicht allein physikalische Eigenschaften und medizinische Möglichkeiten die Hauptrichtung künftiger Entwicklungen bestimmen, sondern in zunehmendem Maße auch Aspekte der Praktikabilität verschiedener Sondenkonzepte bei bestimmten Anwendungsszenarien und die Kompatibilität der Systeme mit der bestehenden Ausrüstung.

Anhang A

Ergänzungen zu theoretischen Fragestellungen

A.1 Interferenz partiell kohärenten Lichts

Dieser Abschnitt skizziert zunächst kurz den allgemeinen Formalismus zur Berechnung der polychromatischen Intensität für partiell kohärentes Licht. Ziel ist die anschließende Verifizierung der Anwendbarkeit von Gleichung (A.4) für die Berechnung der Interferenz bei der optischen Kohärenzmikroskopie (Abschnitte 2.2.1 und 4.1.5).

A.1.1 Formalismus für zeitlich partiell kohärentes Licht

Die Berechnung der polychromatischen, zeitabhängigen Intensität $I(t)$ bei Interferenz partiell kohärenten Lichts (Born u. a. 1993; Lauterborn u. a. 1993) erfolgt prinzipiell durch Integration von zeitabhängigen spektralen Amplitudendichten $A_k(t)\sqrt{S_{\text{src}}(k)}$ zu einer zeitabhängigen, polychromatischen Amplitude $A(t)$, aus deren Betragsquadrat sich nach zeitlicher Mittelung $\langle \cdot \rangle$ über die Integrationsdauer des Detektors die polychromatische Intensität ergibt:

$$I(t) = \langle A(t)A^*(t) \rangle \quad | \quad A(t) = \int_{-\infty}^{\infty} A_k(t)\sqrt{S_{\text{src}}(k)} dk \quad (\text{A.1})$$

Hierbei ist durch $\{A_k(t)\}_k \mid A_k(t) = A_{0k} \exp(i\varphi_k(t))$ ein Satz monochromatischer, normierter Amplituden gegeben. Insbesondere wird von der reellwertigen zu einer komplexwertigen Amplitude gemäß

$$A_{0k}(t) \cos(\varphi_k(t)) \longmapsto A_{0k}(t) \exp(i\varphi_k(t)) \quad (\text{A.2})$$

übergegangen, und bei der zeitlichen Mittelung

$$\langle f(t) \rangle := \lim_{T \rightarrow T_{\text{lim}}} \frac{1}{T} \int_{-T}^0 f(t) dt \quad (\text{A.3})$$

definiert die Zeitkonstante T_{lim} die Dauer, über die der Detektor die Intensitäten mittelt. Üblicherweise wird ein stationäres Wellenfeld angenommen. Damit ist es möglich, in Gleichung (A.3) $T_{\text{lim}} = \infty$ zu setzen, weil die Integrationsdauer T_{lim} deutlich größer ist als die Dauer $\lambda/c \approx 4 \cdot 10^{-15}$ s eines Wellenzuges.

A.1.2 Vereinfachung bei stationären Wellenfeldern

In der einleitenden Darstellung (Abschnitt 2.2.1) wurde die polychromatische Intensität I aus der Amplitude $A(t)$ berechnet, indem zunächst in Gleichung (2.30) die Intensität I_k monochromatisch ermittelt und anschließend die monochromatischen Intensitäten mit Gleichung (2.31) spektral gewichtet integriert wurden. Zusammenfassend wird diese Vorgehensweise (Izatt u. a. 1996) durch

$$I = \int_{-\infty}^{\infty} I_k S_{\text{src}}(k) dk \quad | \quad I_k = \langle A_k(t) A_k^*(t) \rangle \quad (\text{A.4})$$

beschrieben¹. Diese mathematische Vereinfachung ist aufgrund der zeitlichen Mittelung über eine idealisiert unendlich lange Integrationsdauer des Detektors legitimiert. Die Annahme einer unendlich langen Integrationsdauer entspricht der Forderung eines stationären Wellenfeldes. Formal äußert sich dies dadurch, daß I und I_k zeitunabhängig sind. Denn angesichts der Gleichung (A.1) kann Gleichung (A.4) nur gültig sein, wenn die Voraussetzung

$$\langle A_k(t) \sqrt{S_{\text{src}}(k)} dk A_{k'}^*(t) \sqrt{S_{\text{src}}(k')} dk' \rangle = \langle A_k(t) A_k^*(t) \rangle S_{\text{src}}(k) dk \quad \forall k, k' \in \mathbb{R}^+ \quad (\text{A.5})$$

erfüllt ist. Diese aber ist gleichbedeutend mit

$$\langle A_k(t) A_{k'}^*(t) \rangle = 0 \quad \forall k, k' \in \mathbb{R}^+ \quad | \quad k \neq k' . \quad (\text{A.6})$$

Letzteres ist streng nur für $T_{\text{lim}} = \infty$, also für ein stationäres Wellenfeld, erfüllt, denn das Ergebnis einer endlich langen Integration kann bei benachbarten Wellenzahlen aufgrund der sich ausbildenden Schwebung zu nichtverschwindenden Beiträgen führen.

A.1.3 Anwendbarkeit bei der optischen Kohärenzmikroskopie

Bei einem optischen Kohärenzmikroskop kann aufgrund der Rasterbewegung im Probenarm und vor allem wegen der Phasenmodulation im Referenzarm zunächst nicht von einem stationären Wellenfeld ausgegangen werden. Das Feld sollte für mindestens $1/1000$ der Modulationsperiodendauer ν_{mod}^{-1} als stationär angenommen werden

¹Die monochromatische Amplitude $A_k(t)$ und die monochromatische Intensität I_k sind bei dieser Sichtweise jeweils für alle Wellenzahlen k gleich normiert. Die spektrale Gewichtung erfolgt durch Multiplikation der monochromatischen Intensität mit der spektralen Leistungsdichte, woraus die monochromatische Intensitätsdichte $I_k S_{\text{src}}(k)$ resultiert.

können. Für ein schnell endoluminal rasterndes optisches Kohärenzmikroskop (Kapitel 5) ist $\nu_{\text{mod}} = 10$ MHz. Dann wäre $T_{\text{lim}} = \nu_{\text{mod}}^{-1}/1000 = 10^{-10}$ s, womit immer noch über mehr als 10^4 Wellenzüge² gemittelt würde.

Die Gültigkeit der Bedingung (A.6) veranschaulicht folgende Betrachtung: Für zwei benachbarte Wellenlängen λ und λ' sei der Einfluß der Schwebung dann vernachlässigbar, wenn die Schwebungsperiodendauer $\lambda \lambda' / (c |\lambda - \lambda'|) \approx \lambda^2 / (c |\lambda - \lambda'|)$ kleiner als $1/10$ der Integrationsdauer $T_{\text{lim}} = \nu_{\text{mod}}^{-1}/1000$ ist. Dies ist für $|\lambda - \lambda'| > 0,6$ nm der Fall, bei dem experimentell verwendeten Aufbau (Kapitel 3) sogar bereits für $|\lambda - \lambda'| > 0,001$ nm. Dies rechtfertigt, daß in dieser Arbeit die einfachere Gleichung (A.4) zur Berechnung der zeitabhängigen Intensität $I(t)$ an der Stelle des Detektors herangezogen wird. Aufgrund der endlichen Integrationsdauer $T_{\text{lim}} = \nu_{\text{mod}}^{-1}/1000$ bleibt die Zeitabhängigkeit erhalten.

A.2 FOURIERoptik

A.2.1 Definition und Eigenschaften der FOURIERtransformation

In der vorliegenden Arbeit wird die FOURIERtransformation als

$$\mathcal{F}(f(t))|_{\omega} = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (\text{A.7})$$

und die FOURIERrücktransformation als

$$f(t) = \mathcal{F}^{-1}(F(\omega))|_t = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) \exp(i\omega t) d\omega \quad (\text{A.8})$$

definiert. Für ortsabhängige Größen ist analog

$$\mathcal{F}(f(z))|_k = \int_{-\infty}^{\infty} f(z) \exp(-ikz) dz . \quad (\text{A.9})$$

Die Erweiterung der FOURIERtransformation auf mehrere Dimensionen erfolgt in den einzelnen Dimensionen unabhängig voneinander, beispielsweise im zweidimensionalen Fall als

$$\mathcal{F}(g(x, y))|_{f_x, f_y} = \iint_{-\infty}^{\infty} g(x, y) \exp(-ik(x + y)) dx dy . \quad (\text{A.10})$$

Die FOURIERtransformierte einer um den Betrag x_0 verschobenen Funktion ist nach dem Verschiebungssatz (A.11) das Produkt aus der FOURIERtransformierten der unverschobenen Funktion und einem von x_0 abhängigen Phasenfaktor:

$$\mathcal{F}(g(x - x_0))|_{f_x} = \exp(-ikx_0) \mathcal{F}(g(x))|_{f_x} \quad (\text{A.11})$$

²Nimmt man die Bandbreite des Detektors von 90 MHz (Abschnitt 5.2.3) als Grundlage, so ergeben sich sogar mehr als 10^5 Wellenzüge.

A.2.2 Lineare optische Systeme

In der FOURIERoptik (Goodman 1968) wird das elektromagnetische Strahlungsfeld auf einen Skalar in Form der komplexen Amplitude $U(x, y, z)$ reduziert, deren Betrag die Amplitude des elektrischen oder magnetischen Feldvektors und deren Phase die relative Phase der Wellenfront am Ort (x, y, z) beschreibt. Die z -Achse verlaufe axial, also entlang der optischen Achse des optischen Systems. Die x - y -Ebene entspreche den beiden lateralen Dimensionen senkrecht zur aktuellen Richtung der optischen Achse.

Viele optische Systeme können genähert als lineares System verstanden werden, das eine gegebene komplexe Amplitude in der Eintrittsebene linear³ in eine komplexe Amplitude der Austrittsebene transformiert. Beide Ebenen sind senkrecht zur optischen Achse orientiert.

Zur Berechnung der komplexen Amplitude der Austrittsebene aus der Amplitude in der Eintrittsebene muß die Ausbreitung des Strahlungsfeldes entlang der optischen Achse in einem homogenen Medium sowie beim Durchgang durch optische Elemente beschrieben werden. Die Ausbreitung im homogenen Medium wird mit jeweils fortschreitender Näherung durch die paraxiale Näherung, die FRESNELnäherung und die FRAUNHOFERNäherung angenähert. Refraktive optische Elemente und Blenden werden mathematisch durch ihre komplexe Amplitudentransmission $\mathcal{T}(x, y)$ repräsentiert, deren Betrag die Absorption und deren Phase die Wellenfrontretardierung abhängig von den lateralen Koordinaten (x, y) angibt.

Ein lineares optisches System mit einer bildfeldunabhängigen Form der Punktbildfunktion h heißt invariant oder isoplanatisch. Die FOURIERtransformation $\mathcal{F}(h)$ der Punktbildfunktion ist die Übertragungsfunktion. Ein isoplanatisch und verzerrungsfrei abbildendes optisches System überführt eine komplexe Amplitude $U(x_0, y_0, z_0)$ der Objektebene um den Faktor M vergrößert⁴ in die komplexe Amplitude

$$U(x_1, y_1, z_1) = \iint_{-\infty}^{\infty} h\left(x_1 + \frac{x_0}{M}, y_1 + \frac{y_0}{M}\right) U(x_0, y_0, z_0) dx_0 dy_0 \quad (\text{A.12})$$

der Bildebene. Bei Isoplanasie wird das System also weitgehend durch die Punktbildfunktion h charakterisiert.

A.2.3 FRESNELnäherung und -transformation

Die FRESNELbeugung basierend auf dem HUYGENS-FRESNEL-Prinzip⁵ im Rahmen der FOURIERoptik bildet die Grundlage für die effiziente wellenoptische Beschreibung linearer optischer Systeme.

³Die Systemantwort einer Linearkombination von Signalen ist die Linearkombination der Systemantworten der Signale.

⁴Die Vergrößerung M ist bei einer dünnen Linse das Verhältnis aus Bild- und Objektweite.

⁵Dies ist die Erweiterung des HUYGENS-Prinzips der Elementarwellen um Interferenzeffekte.

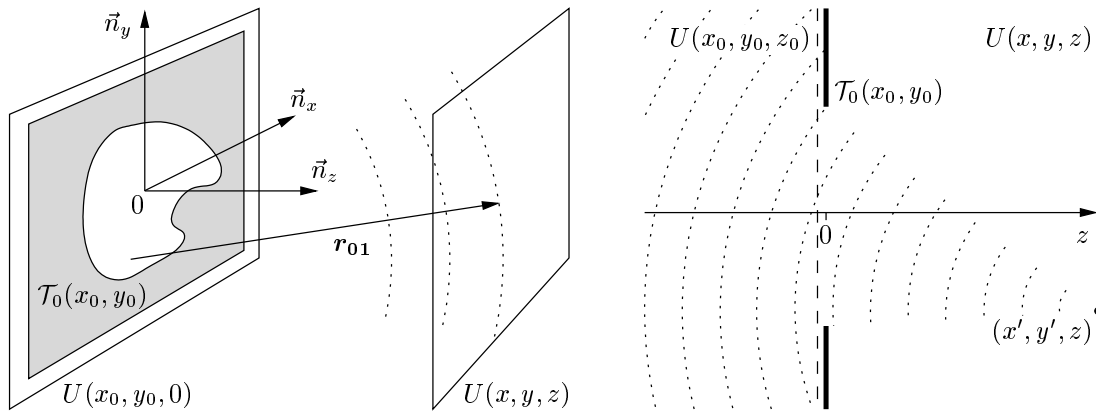


Abbildung A.1 Links: Skizze zur Herleitung der FRESNELtransformation aus dem HUYGENS-FRESNEL-Prinzip. Rechts: Eine Kugelwelle läuft durch eine Blende auf ihr Zentrum zu. Die komplexen Amplitude in der Ebene senkrecht zur optischen Achse durch das Zentrum der Kugelwelle lässt sich mit der FRAUNHOFERNäherung beschreiben.

Ein Amplituden- und Phasenobjekt befinde sich an der Stelle $z_0 = 0$ der optischen Achse (Abbildung A.1). Seine komplexe Amplitudentransmission $\mathcal{T}_0(x_0, y_0)$ nehme nur innerhalb eines begrenzten Bereichs nichtverschwindende Werte an, und r_{\max} sei der maximale Abstand einer transmittierenden, lateralen Koordinate von der optischen Achse, genauer $\exists r_{\max} \in \mathbb{R}^+$: $\mathcal{T}_0(x_0, y_0) = 0 \forall (x_0, y_0) \mid x_0^2 + y_0^2 > r_{\max}^2$. Unmittelbar vor dem Amplituden- und Phasenobjekt sei die komplexe Amplitude $U_0(x_0, y_0, z_0)$ gegeben. Durch Multiplikation mit der komplexen Amplitudentransmission $\mathcal{T}_0(x_0, y_0)$ erhält man die komplexe Amplitude unmittelbar nach dem Objekt. Von jedem Punkt (x_0, y_0) von $U_0(x_0, y_0, z_0)$ $\mathcal{T}_0(x_0, y_0)$ geht eine Elementarwelle h aus, die an der Stelle $(x, y, z) \mid z > z_0$ den Wert

$$h(x_0, y_0, z_0, x, y, z) = \frac{1}{i\lambda|\vec{r}_{01}|} e^{ik|\vec{r}_{01}|} \cos \angle(\vec{n}_z, \vec{r}_{01}) \quad (\text{A.13})$$

hat. Die komplexe Amplitude in der Ebene senkrecht zur optischen Achse im Abstand z vom Ursprung ist dann

$$U(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(x_0, y_0, 0, x, y, z) U(x_0, y_0, 0) \mathcal{T}_0(x_0, y_0) dx_0 dy_0. \quad (\text{A.14})$$

In der paraxialen Näherung nimmt in Gleichung (A.13) $\cos \angle(\vec{n}_z, \vec{r}_{01}) \approx 1$ und im Nenner $|\vec{r}_{01}| \approx z$ an. Mittels der Entwicklung der Wurzelfunktion $\sqrt{1 \pm \varepsilon} \approx 1 \pm \varepsilon/2$ ersetzt die FRESNELnäherung innerhalb der Exponentialfunktion den sphärischen Ausdruck für $|\vec{r}_{01}| = z(1 + ((x-x_0)/z)^2 + ((y-y_0)/z)^2)^{1/2}$ durch einen quadratischen, womit

$$h(x_0, y_0, 0, x, y, z) \approx \frac{1}{i\lambda z} e^{ikz} e^{\frac{ik}{2z}((x-x_0)^2 + (y-y_0)^2)}. \quad (\text{A.15})$$

Damit vereinfacht sich dann Gleichung (A.14) zu der FRESNELtransformation

$$U(x, y, z) = \frac{e^{ikz} e^{\frac{ik}{2z}(x^2+y^2)}}{i\lambda z} \iint_{-\infty}^{\infty} e^{\frac{ik}{2z}(x_0^2+y_0^2)} U(x_0, y_0, 0) \mathcal{T}_0(x_0, y_0) e^{-i(\frac{kx}{z}x_0 + \frac{ky}{z}y_0)} dx_0 dy_0 \quad (\text{A.16})$$

$$= \frac{e^{ikz} e^{\frac{ik}{2z}(x^2+y^2)}}{i\lambda z} \mathcal{F} \left(e^{\frac{ik}{2z}(x_0^2+y_0^2)} U(x_0, y_0, 0) \mathcal{T}_0(x_0, y_0) \right) \Big|_{k_x, k_y} \quad (\text{A.17})$$

wobei durch $k_x = kx/z$ und $k_y = ky/z$ die Ortswellenzahlen gegeben sind, die mit den Ortsfrequenzen f_x und f_y gemäß $k_x = 2\pi f_x$ und $k_y = 2\pi f_y$ zusammenhängen.

A.2.4 FRAUNHOFERNäherung und -transformation

Die FRAUNHOFERNäherung macht die vereinfachende Annahme, daß

$$z \gg k r_{\max}^2 / 2, \quad (\text{A.18})$$

aufgrund derer der Phasenfaktor $e^{\frac{ik}{2z}(x_0^2+y_0^2)}$ in der FRESNELtransformation (A.17) vernachlässigt werden kann. Die resultierende FRAUNHOFERtransformation

$$U(x, y, z) = \frac{e^{ikz} e^{\frac{ik}{2z}(x^2+y^2)}}{i\lambda z} \mathcal{F} (U(x_0, y_0, 0) \mathcal{T}_0(x_0, y_0)) \Big|_{k_x, k_y} \quad (\text{A.19})$$

liefert die komplexe Amplitude in der Austrittsebene als die Fouriertransformierte der Verteilung in der Eintrittsebene.

Die strenge geometrische Bedingung (A.18) ist für Mikroskopobjektive wegen der hohen numerischen Apertur nicht erfüllt. Allerdings beschreibt die vereinfachende FRAUNHOFERtransformation auch das paraxiale Verhalten einer aberrationsfreien Linse in deren Fokalebene. Diese Situation kann durch eine Kugelwelle modelliert werden, die durch eine Apertur auf ihr Zentrum (x', y', z) zuläuft (Abbildung A.1 links). Die Kugelwelle wird ausgehend von der Näherung (A.16) beschrieben durch

$$\begin{aligned} U(x_0, y_0, 0) &= \frac{1}{i\lambda z} e^{ik(z-|\vec{r}_{01})} \approx \frac{1}{i\lambda z} e^{ikz} e^{-ikz} e^{-\frac{ik}{2z}((x'-x_0)^2+(y'-y_0)^2)} \\ &= \frac{1}{i\lambda z} e^{-\frac{ik}{2z}(x'^2+y'^2)} e^{\frac{ik}{2z}(x'x_0+y'y_0)} e^{-\frac{ik}{2z}(x_0^2+y_0^2)} \\ &\simeq \frac{1}{i\lambda z} e^{i(k_{x'}x_0+k_{y'}y_0)} e^{-\frac{ik}{2z}(x_0^2+y_0^2)} \end{aligned} \quad (\text{A.20})$$

Hierbei kann der konstante Phasenfaktor $e^{-\frac{ik}{2z}(x'^2+y'^2)}$ vernachlässigt werden. Einsetzen von Gleichung (A.20) in die FRESNELnäherung (A.17) liefert in Verbindung mit dem Verschiebungssatz (A.11)

$$\begin{aligned} U(x, y, z) &= \frac{e^{ikz} e^{\frac{ik}{2z}(x^2+y^2)}}{i\lambda z} \frac{1}{i\lambda z} e^{-\frac{ik}{2z}(x'^2+y'^2)} \mathcal{F} (e^{i(k_{x'}x_0+k_{y'}y_0)} \mathcal{T}_0(x_0, y_0)) \Big|_{k_x, k_y} \\ &= -\frac{e^{ikz} e^{\frac{ik}{2z}(x^2+y^2)}}{(\lambda z)^2} e^{-\frac{ik}{2z}(x'^2+y'^2)} \mathcal{F} (\mathcal{T}_0(x_0, y_0)) \Big|_{k_x-k_{x'}, k_y-k_{y'}}. \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

Das Ergebnis aus Gleichung (A.21) ist die komplexe Amplitude in der Ebene senkrecht zur optischen Achse durch das Zentrum der Kugelwelle. Folglich entspricht die Punktbildfunktion eines aberrationsfreien optischen Systems der Fouriertransformierten der Aperturöffnung. Bei Isoplanasie darf man für $x' = y' = 0$ annehmen. Der konstante Phasenfaktor $-e^{ikz}$ kann wieder vernachlässigt werden. Damit ist die laterale Punktbildfunktion h eines aberrationsfreien, isoplanatischen optischen Systems

$$h(x, y) = \frac{e^{\frac{ik}{2z}(x^2+y^2)}}{(\lambda z)^2} \mathcal{F}(\mathcal{T}_0(x_0, y_0))|_{k_x, k_y}. \quad (\text{A.22})$$

Das Profil der Punktbildfunktion eines Mikroskopobjektivs mit kreisförmiger Apertur berechnet sich (Born u. a. 1993) daher zu der AIRY-Funktion.

A.3 Berechnungen und Formeln

A.3.1 Normierung GAUSSförmiger spektraler Leistungsdichten

Die Normalverteilungsfunktion zur Standardabweichung σ ist durch

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-x_0}{\sigma}\right)^2\right) \quad (\text{A.23})$$

gegeben, wobei ihr Integral auf 1 normiert ist (Bronstein u. a. 1993). Sie hat die Halbwertsbreite $\Delta x = 2\sigma\sqrt{2\ln 2}$, so daß

$$\mathcal{G}(x) = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi}\Delta x} \exp\left(-\left(2\sqrt{\ln 2} \frac{x-x_0}{\Delta x}\right)^2\right) \quad | \quad \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{G}(x) dx = 1 \quad (\text{A.24})$$

eine GAUSSfunktion der Halbwertsbreite Δx mit einem Maximum an der Stelle x_0 beschreibt. Entsprechend ist

$$S_{\text{src}}(k) = P_{\text{src}} \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi}\Delta k} \exp\left(-\left(2\sqrt{\ln 2} \frac{k-k_0}{\Delta k}\right)^2\right) \quad (\text{A.25})$$

die Wellenzahldarstellung der spektralen Leistungsdichtefunktion einer Lichtquelle, die über eine Gesamtleistung P_{src} und ein GAUSSförmiges Spektrum mit Halbwertsbreite Δk und Zentralwellenlänge $2\pi/k_0$ verfügt.

A.3.2 Verwendung eines Monomodennichtwellenleiters

Die folgenden Berechnungen werden zur Herleitung der Abbildungsgleichung bei Verwendung eines Monomodennichtwellenleiters benötigt. Wegen $|z|^2 = zz^* \forall z \in \mathbb{C}$ gilt $|\int_{-\infty}^{\infty} f(x) dx|^2 = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) f^*(x') dx dx'$ für eine komplexwertige Funktion $f(x)$.

Damit ergibt Einsetzen der Gleichungen (2.9) und (2.16) in Gleichung (2.17) unter Vernachlässigung der Integration über den Phasenfaktor aus Gleichung (2.9)

$$\begin{aligned}
I(x, y) &= \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} h(x_1 + \frac{x_2}{M}, y_1 + \frac{y_2}{M}) h^*(x'_1 + \frac{x'_2}{M}, y'_1 + \frac{y'_2}{M}) \\
&\quad h(x_0 + Mx_1, y_0 + My_1) h^*(x_0 + Mx'_1, y_0 + My'_1) \\
&\quad M^4 a_0 f_0(x_0, y_0) a_0^* f_0^*(x_0, y_0) \\
&\quad \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) \mathcal{O}^*(x'_1 - x, y'_1 - y) \\
&\quad dx_0 dy_0 dx_1 dy_1 dx'_1 dy'_1 \\
&\quad f_0(x_2, y_2) f_0^*(x'_2, y'_2) dx_2 dy_2 dx'_2 dy'_2 \\
&= \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) \mathcal{O}^*(x'_1 - x, y'_1 - y) \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} h(x_1 + \frac{x_2}{M}, y_1 + \frac{y_2}{M}) f_0(x_2, y_2) dx_2 dy_2 \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} h^*(x'_1 + \frac{x'_2}{M}, y'_1 + \frac{y'_2}{M}) f_0^*(x'_2, y'_2) dx'_2 dy'_2 \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} h(x_0 + Mx_1, y_0 + My_1) M^2 a_0 f_0(x_0, y_0) dx_0 \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} h^*(x_0 + Mx'_1, y_0 + My'_1) M^2 a_0^* f_0^*(x_0, y_0) dy_0 \\
&\quad dx_1 dy_1 dx'_1 dy'_1, \tag{A.26}
\end{aligned}$$

und mit der Definition (2.20) und Gleichung (2.19) resultiert daraus unmittelbar Gleichung (2.17):

$$\begin{aligned}
I(x, y) &= \iiint_{-\infty}^{\infty} \iiint_{-\infty}^{\infty} \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) \mathcal{O}^*(x'_1 - x, y'_1 - y) \\
&\quad (\hat{h} \otimes f_0)(-Mx_1, -My_1) (\hat{h}^* \otimes f_0^*)(-Mx'_1, -My'_1) \\
&\quad M^2 (h \otimes a_0 f_0)(-Mx_1, -My_1) M^2 (h^* \otimes a_0^* f_0^*)(-Mx'_1, -My'_1) \\
&\quad dx_1 dy_1 dx'_1 dy'_1 \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} M^2 ((\hat{h} \otimes f_0)(h \otimes a_0 f_0))(-Mx_1, -My_1) \\
&\quad \mathcal{O}(x_1 - x, y_1 - y) dx_1 dy_1 \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} M^2 ((\hat{h}^* \otimes f_0^*)(h^* \otimes a_0^* f_0^*))(-Mx'_1, -My'_1) \\
&\quad \mathcal{O}^*(x'_1 - x, y'_1 - y) dx'_1 dy'_1 \\
&= |(h_f \otimes \mathcal{O})(x, y)|^2 \tag{A.27}
\end{aligned}$$

A.3.3 Monochromatische Interferenz

Im Rahmen der Erarbeitung der mathematischen Grundlagen der Simulation ist die Berechnung der monochromatischen Intensität für das dort verwendete Beleuchtungs- und Gewebemodell erforderlich (Abschnitt 4.1.5):

$$\begin{aligned}
I_k(t) &= \langle A_k(t) A_k^*(t) \rangle \\
&= \langle (A_{rk}(l_d, t) + A_{sk}(l_d, t))(A_{rk}^*(l_d, t) + A_{sk}^*(l_d, t)) \rangle \\
&= \langle A_{rk}(l_d, t) A_{rk}^*(l_d, t) \rangle + \sum_{i=1}^{N_R} \langle A_{rk}(l_d, t) A_{sk}^{i*}(l_d, t) \rangle \\
&\quad + \sum_{i=1}^{N_R} \langle A_{sk}^i(l_d, t) A_{rk}^*(l_d, t) \rangle + \sum_{i,j=1}^{N_R} \langle A_{sk}^i(l_d, t) A_{sk}^{j*}(l_d, t) \rangle \\
&= \langle A_{rk}(l_d, t) A_{rk}^*(l_d, t) \rangle \\
&\quad + \sum_{i=1}^{N_R} \langle (A_{rk}(l_d, t) A_{sk}^{i*}(l_d, t) + (A_{rk}(l_d, t) A_{sk}^{i*}(l_d, t))^*) \rangle \\
&\quad + \sum_{i=1}^{N_R} \langle A_{sk}^i(l_d, t) A_{sk}^{i*}(l_d, t) \rangle \\
&\quad + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i < j}}^{N_R} \langle A_{sk}^i(l_d, t) A_{sk}^{j*}(l_d, t) \rangle + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i > j}}^{N_R} \langle A_{sk}^i(l_d, t) A_{sk}^{j*}(l_d, t) \rangle \\
&= |A_{rk}(l_d, t)|^2 + \sum_{i=1}^{N_R} 2 \operatorname{Re}((A_{rk}(l_d, t) A_{sk}^{i*}(l_d, t))) \\
&\quad + \sum_{i=1}^{N_R} |A_{sk}^i(l_d, t)|^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i < j}}^{N_R} 2 \operatorname{Re}(A_{sk}^i(l_d, t) A_{sk}^{j*}(l_d, t)) \\
&= (A_0 \xi (\xi - 1) \sqrt{R_r} \zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t))^2 \\
&\quad + \sum_{i=1}^{N_R} (A_0 \xi (\xi - 1))^2 \zeta_r \zeta_{\text{mod}}(\omega_{\text{mod}} t) \zeta_s \sqrt{R_r} \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) \\
&\quad 2 \cos(2k(l_r + z_r + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t) - l_s - z_s^i(t))) \\
&\quad + \sum_{i=1}^{N_R} (A_0 (\xi - 1) \xi \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t)} h_s(z_s^i(t)) \zeta_s)^2 \\
&\quad + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i < j}}^{N_R} (A_0 (\xi - 1) \xi \zeta_s)^2 \sqrt{\mathcal{R}_s^i(t) \mathcal{R}_s^j(t)} h_s(z_s^i(t)) h_s(z_s^j(t)) \\
&\quad 2 \cos(2k(z_s^i(t) - z_s^j(t))) \tag{A.28}
\end{aligned}$$

Die additive Überlagerung zweier Wellen der Kreisfrequenz ω mit unterschiedlichen

Amplituden A_1 und A_2 und Phasenverschiebungen φ_1 und φ_2 ergibt allgemein $A(t) = A_1 \exp(i(\varphi_1 - \omega t)) + A_2 \exp(i(\varphi_2 - \omega t))$. Die Intensität $A(t) A^*(t)$ der Interferenz der beiden Wellen beträgt dann

$$\begin{aligned}
 A(t) A^*(t) &= (A_1 \exp(i(\varphi_1 - \omega t)) + A_2 \exp(i(\varphi_2 - \omega t))) \\
 &\quad (A_1 \exp(-i(\varphi_1 - \omega t)) + A_2 \exp(-i(\varphi_2 - \omega t))) \\
 &= A_1^2 + A_1 A_2 \exp(i(\varphi_1 - \omega t)) \exp(-i(\varphi_2 - \omega t)) + \\
 &\quad A_2 A_1 \exp(i(\varphi_2 - \omega t)) \exp(-i(\varphi_1 - \omega t)) + A_2^2 \\
 &= A_1^2 + A_2^2 + A_1 A_2 (\exp(i(\varphi_1 - \varphi_2)) + \exp(i(\varphi_2 - \varphi_1))) \\
 &= A_1^2 + A_2^2 + 2A_1 A_2 \cos(\varphi_1 - \varphi_2). \tag{A.29}
 \end{aligned}$$

A.3.4 Spezielle FOURIERtransformationen

Harmonische Phasenmodulation einer Cosinusfunktion

Die FOURIERtransformierte des phasenmodulierten Signals $\cos(\omega t + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t))$ soll berechnet werden. Unter Verwendung der Reihenentwicklungen

$$\cos(A \sin \psi) = J_0(A) + 2 \sum_{m=1}^{\infty} J_{2m}(A) \cos(2m\psi) \tag{A.30}$$

$$\sin(A \sin \psi) = 2 \sum_{m=1}^{\infty} J_{2m-1}(A) \sin((2m-1)\psi) \tag{A.31}$$

(Jackson und Jones 1989) und einiger trigonometrischer Multiplikations- und Additionstheoreme resultiert:

$$\begin{aligned}
 \cos(\varphi + A \sin \psi) &= \cos \varphi \cos(A \sin \psi) - \sin \varphi \sin(A \sin \psi) \\
 &= J_0(A) \cos \varphi + 2 \sum_{m=1}^{\infty} J_{2m}(A) \cos \varphi \cos(2m\psi) \\
 &\quad - 2 \sum_{m=1}^{\infty} J_{2m-1}(A) \sin \varphi \sin((2m-1)\psi) \tag{A.32}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= J_0(A) \cos \varphi + \sum_{m=1}^{\infty} J_{2m}(A) (\cos(\varphi - 2m\psi) + \cos(\varphi + 2m\psi)) \\
 &\quad - \sum_{m=1}^{\infty} J_{2m-1}(A) (\cos(\varphi - (2m-1)\psi) - \cos(\varphi + (2m-1)\psi)) \\
 &= J_0(A) \cos \varphi + \sum_{m=1}^{\infty} J_m(A) ((-1)^m \cos(\varphi - m\psi) + \cos(\varphi + m\psi)) \tag{A.33}
 \end{aligned}$$

Das Spektrum des phasenmodulierten Signals ergibt sich durch Fouriertransformation unter Verwendung von

$$\begin{aligned} & \mathcal{F}(\cos(\omega t + A_{\text{mod}} \sin(\omega_{\text{mod}} t)))|_{\omega} \\ &= J_0(A_{\text{mod}}) \delta(\omega) \\ &+ \sum_{m=1}^{\infty} J_m(A_{\text{mod}}) ((-1)^m \delta(\omega - m\omega_{\text{mod}}) + \delta(\omega + m\omega_{\text{mod}})) \end{aligned} \quad (\text{A.34})$$

Produkte aus Sinus- und Cosinusfunktionen verschiedener Oberfrequenzen

Folgende FOURIERtransformationen wurden für $n, m \in \mathbb{N}$ mittels Mathematica 4.2 (Wolfram Research) berechnet:

$$\begin{aligned} & \mathcal{F}(\sin(n\omega_{\text{mod}} t + \varphi) \sin(m\omega_{\text{mod}} t))|_{\omega} \\ &= \frac{\pi}{2} (\exp(-i\varphi) (\delta(\omega - (m-n)\omega_{\text{mod}}) - \delta(\omega + (m+n)\omega_{\text{mod}})) \\ &+ \exp(i\varphi) (\delta(\omega + (m-n)\omega_{\text{mod}}) - \delta(\omega - (m+n)\omega_{\text{mod}}))) \end{aligned} \quad (\text{A.35})$$

$$\begin{aligned} & \mathcal{F}(\sin(n\omega t + \varphi) \cos(m\omega t))|_{\omega} \\ &= i \frac{\pi}{2} (\exp(-i\varphi) (\delta(\omega - (m-n)\omega_{\text{mod}}) + \delta(\omega + (m+n)\omega_{\text{mod}})) \\ &- \exp(i\varphi) (\delta(\omega + (m-n)\omega_{\text{mod}}) + \delta(\omega - (m+n)\omega_{\text{mod}}))) \end{aligned} \quad (\text{A.36})$$

Für den Spezialfall $n = 1$ resultiert

$$\mathcal{F}(\sin(\omega t + \varphi) \sin(m\omega t))|_{\omega} = \frac{\pi}{2} \omega \exp(-i\varphi) (\delta(m-2) - \delta(m+2)) \quad (\text{A.37})$$

$$\begin{aligned} \mathcal{F}(\sin(\omega t + \varphi) \cos(m\omega t))|_{\omega} &= i \frac{\pi}{2} \omega (\exp(i\varphi) (\delta(m-2) - \delta(m+2)) \\ &- 2 \exp(-i\varphi) \delta(m)) , \end{aligned} \quad (\text{A.38})$$

und für den Spezialfall $n = 1$ und $m = 0$ ist

$$\begin{aligned} & \mathcal{F}(\sin(\omega_{\text{mod}} t + \varphi))|_{\omega} \\ &= i\pi (\exp(-i\varphi) \delta(\omega + \omega_{\text{mod}}) - \exp(i\varphi) \delta(\omega - \omega_{\text{mod}})) . \end{aligned} \quad (\text{A.39})$$

Produkt aus Cosinusfunktion und GAUSSfunktion

Die FOURIERtransformation einer GAUSSfunktion ist für die Parameter $\alpha \in \mathbb{R}$ und $\beta \in \mathbb{R}^+$ gegeben durch

$$\mathcal{F}(\exp(-(\beta(k-\gamma))^2))|_z = \frac{\sqrt{\pi}}{\beta} \exp\left(-i\gamma z - \left(\frac{z}{2\beta}\right)^2\right) \quad (\text{A.40})$$

$$\mathcal{F}^{-1}(\exp(-(\beta(k-\gamma))^2))|_z = \frac{1}{2\sqrt{\pi}\beta} \exp\left(i\gamma z - \left(\frac{z}{2\beta}\right)^2\right) \quad (\text{A.41})$$

(Bronstein u. a. 1993). Damit berechnet sich die FOURIERtransformation eines Produktes aus Cosinus- und GAUSSfunktion zu

$$\begin{aligned}
& \int_{-\infty}^{\infty} \cos(\alpha k) \exp(-(\beta(k - \gamma))^2) dk \\
&= \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{\infty} (\exp(i\alpha k) + \exp(-i\alpha k)) \exp(-(\beta(k - \gamma))^2) dk \\
&= \frac{1}{2} (2\pi \mathcal{F}^{-1}(\exp(-(\beta(k - \gamma))^2))|_{\alpha} + \mathcal{F}(\exp(-(\beta(k - \gamma))^2))|_{\alpha}) \\
&= \frac{1}{2} \left(2\pi \frac{1}{2\sqrt{\pi}\beta} \exp\left(i\gamma\alpha - \left(\frac{\alpha}{2\beta}\right)^2\right) + \frac{\sqrt{\pi}}{\beta} \exp\left(-i\gamma\alpha - \left(\frac{\alpha}{2\beta}\right)^2\right) \right) \\
&= \frac{\sqrt{\pi}}{\beta} \exp\left(-\left(\frac{\alpha}{2\beta}\right)^2\right) \frac{1}{2} (\exp(i\gamma\alpha) + \exp(-i\gamma\alpha)) \\
&= \frac{\sqrt{\pi}}{\beta} \exp\left(-\left(\frac{\alpha}{2\beta}\right)^2\right) \cos(\gamma\alpha). \tag{A.42}
\end{aligned}$$

Insbesondere gilt für den Fall $\alpha = 2z$, $\beta = 2\sqrt{\ln 2}/\Delta k$ und $\gamma = k_0$

$$\begin{aligned}
& \int_{-\infty}^{\infty} \cos(2kz) \exp\left(-\left(2\sqrt{\ln 2} \frac{k - k_0}{\Delta k}\right)^2\right) dk \\
&= \frac{\sqrt{\pi} \Delta k}{2\sqrt{\ln 2}} \exp\left(-\left(\frac{2\Delta k z}{4\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right) \cos(2k_0 z). \tag{A.43}
\end{aligned}$$

Anhang B

Ergänzungen zu experimentellen Fragestellungen

B.1 Laboraufbau

B.1.1 Leistungsbilanz im Interferometer

Der Leistungsfluß im Interferometer wurde mit einem Spiegel als Probe bei optimaler Justage der Einkopplung im Referenzarm vermessen (Tabelle B.1). Dazu wurde der Detektor in Proben-, Referenz- oder Detektionsarm an das jeweilige Lichtwellenleiterende des Strahlteilers angeschlossen. Gegebenenfalls war dabei der Proben- oder der Referenzarm blockiert. Zur Messung der Ausgangsleistung P_0 der Lichtquelle wurde diese über einen Lichtwellenleiter mit dem Detektor verbunden. Die Summe der aus Proben- und Referenzarm emittierten Leistungen ist allerdings größer als die so bestimmte Ausgangsleistung, was nahelegt, daß die Einkopplung in diesen Lichtwellenleiter verlustreicher ist als die Einkopplung in den Strahlteiler.

	Ausgang	Blockade		Meßergebnis			Theorie Leistung [P_0]
		Proben-arm	Referenz-arm	Spannung [mV]	Leistung [mW] [P_0]		
P_0	Lichtquelle			4500	8,5	100%	100%
P_{1r}	Referenzarm			2540	4,79	56,4%	50%
P_{1s}	Probenarm			2360	4,45	52,4%	50%
P_{2r}	Detektionsarm	×		184	0,347	4,1%	23,75%
P_{2s}	Detektionsarm		×	506	0,955	11,2%	23,75%
P_{bias}	Detektionsarm	×	×	50	0,094	1,1%	0%

Tabelle B.1 Leistungsbilanz im Interferometer für einen Spiegel als Probe. Die Leistung wurde am Ausgang der Lichtquelle und an den Ausgängen der verschiedenen Arme des Interferometers gemessen, wobei Proben- und Referenzarm blockiert sein konnten.

Mit dem Reflexionsvermögen von 0,95 der Spiegel in Proben- und Referenzarm ergibt sich die Einkopplungseffizienz im Referenzarm zu $\zeta_r = (P_{2r}/0,95)/(P_{1r}/2) = 15\%$ und im Probenarm zu $\zeta_s = (P_{2s}/0,95)/(P_{1s}/2) = 45\%$. Die Leistungen aus Proben- und Referenzarm verhalten sich $P_{2s}/P_{2r} \approx 3 : 1$. Der Untergrund P_{bias} resultiert fast vollständig aus der Reflexion an dem FC/PC-Stecker im Probenarm. Er verschwindet nahezu vollständig, wenn man das Steckerende in destilliertes Wasser eintaucht.

B.1.2 Positionsrückmeldungsregelung des Rasterverschiebetischs

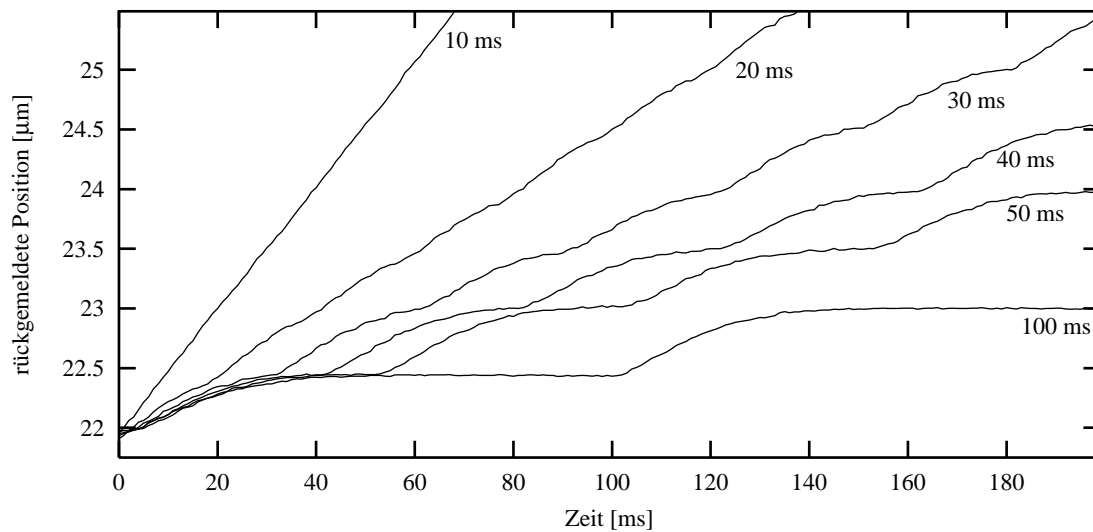


Abbildung B.1 Linearität der Bewegung des piezoelektrischen Rasterverschiebetischs für verschiedene Rastergeschwindigkeiten zwischen $5 \mu\text{m/s}$ und $50 \mu\text{m/s}$. Zu jeder Kurve ist der zeitliche Abstand zwischen den Aktualisierungen der von der Datenakquisitionskarte ausgegebenen Steuerspannung U_x angegeben. Ab einer Rastergeschwindigkeit von $50 \mu\text{m/s}$ kann man von einer linearen Bewegung sprechen.

B.1.3 Polarisationsgrad der Lichtquelle

Die Superlumineszenzdiolen der Lichtquelle befinden sich in einem Metallgehäuse, aus dem ein Monomodenlichtwellenleiter zu einer FC/PC-Kupplung in der Frontplatte des Gerätes geführt wird. Ausgang der Quelle ist eine FC/PC-Kupplung. Die Messung der Polarisation der Dioden ist daher nicht direkt möglich, weil ein Monomodenlichtwellenleiter wie in Abschnitt 3.1.2 erläutert den Polarisationszustand und die Polarisationsrichtung manipuliert.

Der Polarisationsgrad Γ_{pol} als Anteil linear polarisierten Lichts an der Gesamtleistung P_0 wurde direkt am Ausgang der Lichtquelle und im Referenzarm gemessen. Dazu wurde ein GLAN-Polarisator in den Strahlengang eingesetzt und pro Meßdurchgang

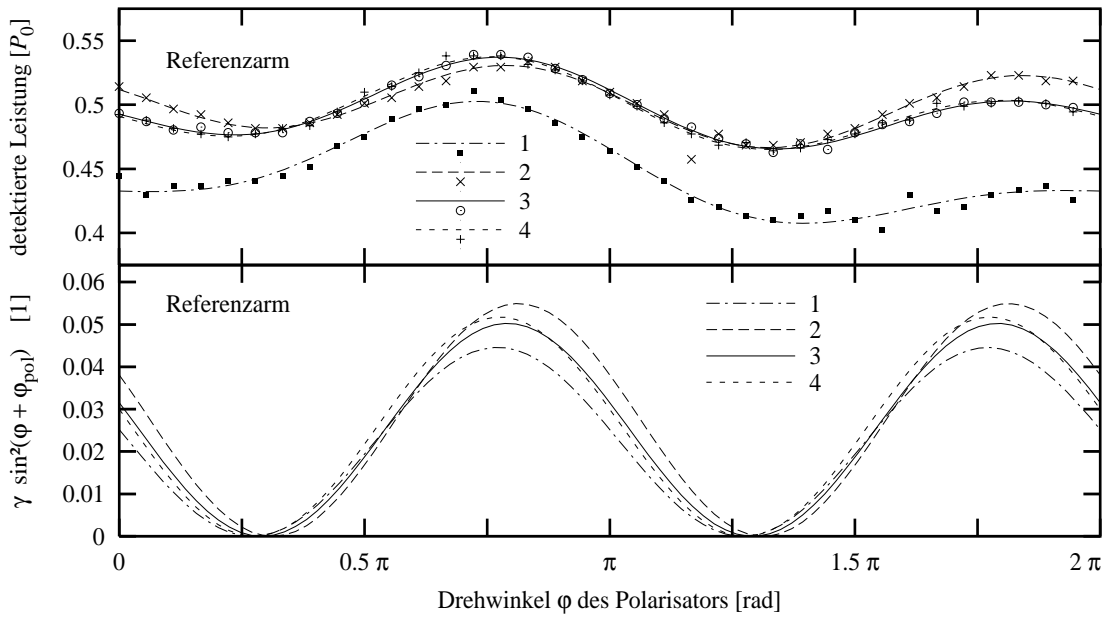


Abbildung B.2 Messung von Polarisationsgrad und -richtung im Referenzarm. *Oben:* Gemessene Leistung abhängig von der Polarisatorstellung und Ergebnisse der Anpassungen des Modells aus Gleichung (B.2). Die Kurve 1 weist eine geringere Gesamtintensität auf, weil während ihrer Messung ein Teil der Apertur des Referenzarmspiegels bedeckt war. *Unten:* Linear polarisierter Anteil gemäß der angepassten Parameter.

abhängig von dessen Drehwinkel¹ φ um die optische Achse die transmittierte Leistung P_{pol} bestimmt. Die Ausgangsleistung der Lichtquelle betrug 9 mW. Auf den linear polarisierten Anteil Γ_{pol} des Lichts wirkt der Polarisator in beiden Fällen wie ein Analysator. Von dem unpolarisierte Anteil $(1 - \Gamma_{\text{pol}})$ wird nur die Hälfte transmittiert. Demnach wäre die Beziehung

$$\frac{P_{\text{pol}}(\varphi)}{P_0} = \frac{1 - \Gamma_{\text{pol}}}{2} + \Gamma_{\text{pol}} \sin^2(\varphi - \varphi_{\text{pol}}) \quad (\text{B.1})$$

zu erwarten, wobei φ_{pol} die Polarisationsrichtung markiert.

Der Polarisationsgrad im Referenzarm wurde mehrmals gemessen (Abbildung B.2 *oben*), indem der GLAN-Polarisator in den offenen Strahl im Referenzarm eingebracht und abhängig von seiner Rotation um die optische Achse die detektierte Leistung P_{pol} bestimmt wurde. Dabei befand sich keine Probe im Probenarm, und der Polarisator wurde für jede Messung erneut eingesetzt und justiert. Man erkennt in den resultierenden Kurven einen konstanten Untergrund und einen variablen Anteil, der während einer Volldrehung des Polarisators erwartungsgemäß zwei Maxima und zwei Minima durchläuft.

¹Die Winkelangabe von 0° bezieht sich auf die Orientierung des Polarisators derart, daß der Luftspalt zwischen den Prismen detektorseitig waagrecht am unteren Rand des Polarisators liegt. Der Drehwinkel bezeichnet die Drehung gegen den Uhrzeigersinn bei Blickrichtung entlang der optischen Achse zur Lichtquelle.

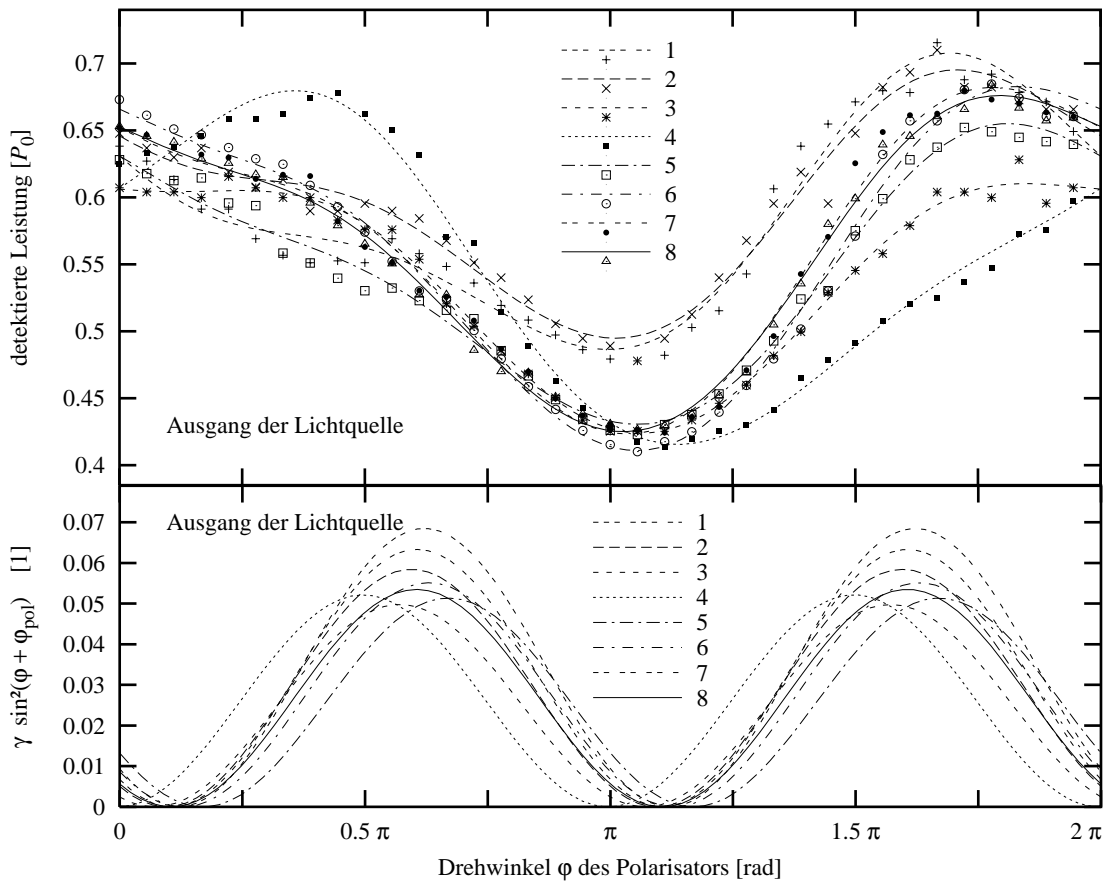


Abbildung B.3 Messung von Polarisationsgrad und -richtung am Ausgang der Lichtquelle. *Oben:* Gemessene Leistung abhängig von der Polarisatorstellung und Ergebnisse der Anpassungen des Modells aus Gleichung (B.2). Die Kurven 1 und 2 wichen wegen einer anderen Detektorjustage ab. *Unten:* Linear polarisierter Anteil gemäß der angepassten Parameter.

Um den Polarisationsgrad am Ausgang der Lichtquelle zu messen (Abbildung B.3 *oben*), wurde der Detektor auf einem Verschiebetisch derart positioniert und ausgerichtet, daß im Abstand von 7,2 cm zwischen den einander zugewandten Enden der FC/PC-Kupplungen von Lichtquelle und Detektor die detektierte Leistung maximal wird. Vor jedem Meßdurchgang wurde der Polarisator auf einer Justageeinrichtung mit zwei Rotationsfreiheitsgraden neu in den divergenten Strahlengang eingesetzt und justiert. Problematisch ist bei dieser Konfiguration, daß das durch den Polarisator tretende Strahlbündel einerseits divergent und andererseits wegen der Streuung in der FC/PC-Kupplung nicht mehr notwendigerweise GAUSSförmig verteilt und symmetrisch ist. Dies spiegelt sich in den Meßdaten durch die Dominanz eines Faktors der Form $a + b \sin(\varphi + \varphi_a)$ wider.

Für eine numerische Anpassung an die Messungen im Referenzarm und am Ausgang der Lichtquelle wird daher das Modell

$$\frac{P_{\text{pol}}(\varphi)}{P_0} = (a + b \sin(\varphi + \varphi_a)) \left(\frac{1}{2} + \gamma \sin^2(\varphi + \varphi_{\text{pol}}) \right) \quad (\text{B.2})$$

	Ausgang der Lichtquelle					Referenzarm				
	a [1]	b [%]	φ_a [rad]	γ [%]	φ_{pol} [rad]	a [1]	b [%]	φ_a [rad]	γ [%]	φ_{pol} [rad]
1	1,097	16,9	2,142	6,850	2,762	0,8552	7,15	-0,456	4,457	2,291
2	1,129	15,8	1,900	5,844	2,843	0,9486	1,70	0,158	5,493	2,158
3	1,028	18,1	1,394	4,979	2,919	0,9447	3,30	-0,575	5,026	2,227
4	1,038	23,3	0,852	5,215	3,153	0,9431	3,26	-0,539	5,174	2,276
5	1,036	19,4	1,689	5,135	2,608					
6	1,061	24,8	1,564	5,514	2,734					
7	1,062	22,6	1,664	6,335	2,809					
8	1,067	22,6	1,672	5,350	2,811					
	Mittelwert			5,653	2,830	Mittelwert			5,038	2,238
	Standardabweichung			0,650	0,159	Standardabweichung			0,433	0,060

Tabelle B.2 Ergebnisse der Anpassung des Modells aus Gleichung (B.2) an die relativen Leistungen aus den Meßdurchgängen am Ausgang der Lichtquelle und im Referenzarm. Die resultierenden Kurven sind in den Abbildungen B.3 und B.2 eingezeichnet.

herangezogen, bei dessen Verwendung der Polarisationsgrad Γ_{pol} gemäß

$$\Gamma_{\text{pol}} = \frac{\gamma}{1 + \gamma} \quad (\text{B.3})$$

aus dem Parameter γ hervorgeht. Die Transmission des Polarisators liegt bei $> 0,9$ Durchgang und ist als gemeinsamer Faktor in den Koeffizienten a und b enthalten.

Die Ergebnisse der numerischen Anpassung (Abbildungen B.2 und B.3) liefern für den Referenzarm einen leicht geringeren Polarisationsgrad als für den Ausgang der Lichtquelle, vermutlich, weil ein Teil der linearen Polarisation auf dem Weg durch die Lichtwellenleiter verloren geht. In beiden Fällen streuen die angepaßten Parameter γ und φ_{pol} kaum. Bei einigen Messungen war die Apertur teilweise bedeckt oder die Justage nicht optimal, wodurch aber die Ergebnisse für γ und φ_{pol} nicht beeinträchtigt wurden, was für das gewählte Modell spricht.

Durch Mittelung der angepaßten Parameter (Tabelle B.2) erhält man am Ausgang der Lichtquelle einen Polarisationswinkel von $\varphi_{\text{pol}} = 162^\circ \pm 9^\circ$ und $\gamma = 5,7\% \pm 0,7\%$, was einem Polarisationsgrad von $\Gamma_{\text{pol}} = 5,4\% \pm 0,7\%$ entspricht. Für den Referenzarm sind analog $\varphi_{\text{pol}} = 128^\circ \pm 3^\circ$, $\gamma = 5,0\% \pm 0,4\%$ und $\Gamma_{\text{pol}} = 4,8\% \pm 0,4\%$. Faßt man beide Ergebnisse zusammen, so resultiert ein Polarisationsgrad von $5,1^\circ \pm 0,8^\circ$.

B.1.4 Absolute Messung der Modulationsamplitude

Die frequenzabhängige Modulationsamplitude wurde für den ursprünglichen Aufbau der Verzögerungsstrecke (Abbildung B.4) und den mechanisch verbesserten Aufbau (Abbildung 3.11) absolut vermessen. Dazu wurde das konfokale Mikroskop so vor

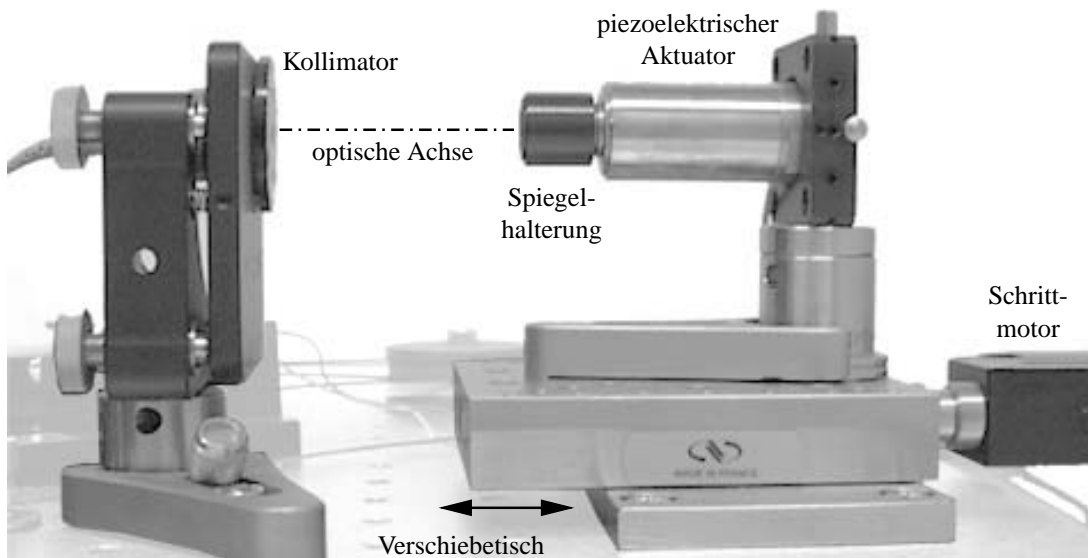


Abbildung B.4 Verzögerungsstrecke vor der mechanischen Verbesserung (Abbildung 3.11) der Halterung des piezoelektrischen Ringaktuator.

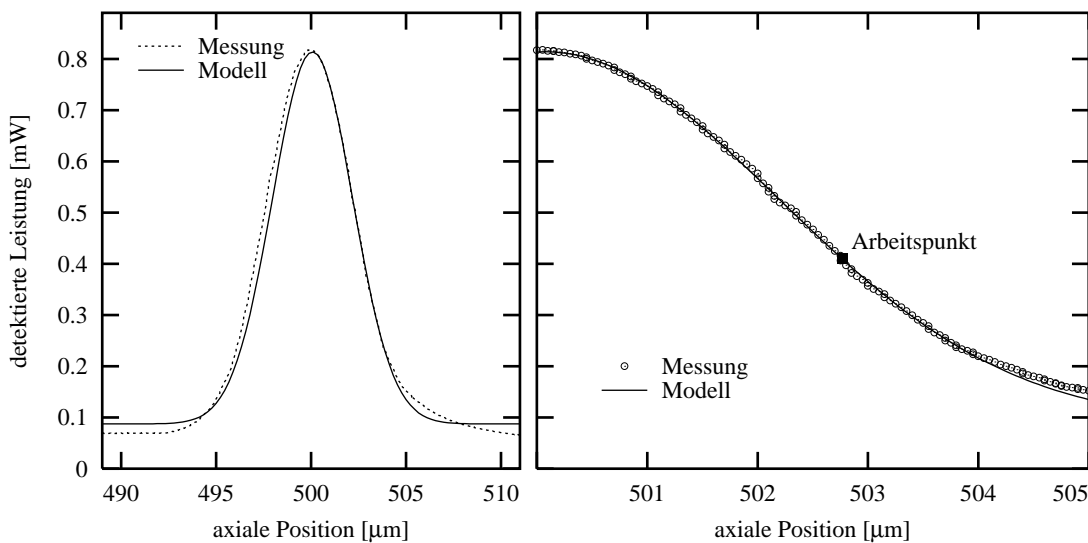


Abbildung B.5 Axiale Punktbildfunktion, deren Umkehrfunktion bei der absoluten Messung der Modulationsamplitude verwendet wurde. *Links:* Die Anpassung eines GAUSSförmigen Modells der Form $P(z) = b + a \exp(c(z - d)^2)$. *Rechts:* Der Arbeitspunkt wird auf die Hälfte der Intensität in der Bildebene gelegt. Die gute Annäherung um den Arbeitspunkt ist systematisch, weshalb die hier für die Messung vor Umbau der Verzögerungsstrecke gezeigten Daten repräsentativ für alle Messungen sind.

den Referenzarmspiegel montiert, daß dieser fokussiert werden konnte und seine Oberfläche senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops ausgerichtet war.

In einer solchen Konfiguration kann bei ausgeschalteter Modulation durch axiales Verfahren des Referenzarmspiegels mit dem Schrittmotor die axiale Punktbildfunktion

aufgenommen und an das GAUSSförmiges Modell $P(z) = b + a \exp(c(z - d)^2)$ angepaßt werden (Abbildung B.5). Anschließend wird der Abstand auf einen Arbeitspunkt auf einer abfallenden Flanke der axialen Punktbildfunktion eingestellt. Nach Einschalten der Modulation wird die zeitabhängige Spiegelposition z über die Umkehrfunktion $z(P) = \sqrt{\ln((P - b)/a)/c} + d$ aus der detektierten Leistung P ermittelt und so die Modulationsamplitude A_{mod} absolut gemessen.

B.1.5 Software zur Bedienung des optischen Kohärenzmikroskops

Für den Betrieb des Laboraufbaus und die Auswertung und Darstellung der damit aufgenommenen Bilder ist eine entsprechende, programmgesteuerte Datenaufnahme und -auswertung erforderlich. Im vorliegenden Fall wurde eine Software mit graphischer Benutzeroberfläche (Abbildung B.6) in G (LabVIEW) zur Steuerung, Auswertung und Dokumentation entwickelt. Sie umfaßt die nachfolgend beschriebenen Funktionen.

Systematische Initialisierung des Gerätes

Die Software unterstützt die systematische Inbetriebnahme des Systems, und zwar durch Module zur Messung der Laserquellenleistung aus dem Signaluntergrund, Messung der Referenzarmeinkopplungseffizienz zur Optimierung derselben, Fokussierung des Mikroskops auf Deckglasober- oder unterseite (Abschnitt 3.1.6), automatischer Abgleich der Referenzarmlänge (Abschnitt 3.1.6) sowie die automatische Einstellung der Modulationsamplitude (Abschnitt 3.1.6). Die diesen Aufgaben zugrundeliegenden Algorithmen mußten entwickelt werden.

Die Inbetriebnahme erfolgt über die Funktionen des Menüs *Setup*.

Verschiedene Meßprogramme

Neben den einfachen Reflexions- und Kohärenzmikroskopbildern können noch Bild-daten in verschiedenen 3D-Aufnahmemodi generiert werden. Dabei kann die Bildebene lateral-lateral oder axial-lateral liegen, wobei die schnelle Rasterrichtung immer lateral liegt. Die 3D-Bildaufnahmefunktionen sind für die Kohärenzmikroskopie teilweise nicht geeignet, da die Referenzarmlänge aufgrund der Ungenauigkeiten bei der dynamischen Positionierung der Schrittmotoren unzureichend angepaßt sein kann.

Ist ein Spiegel als Probe fokussiert und der Referenzarm abgeglichen, so kann unmittelbar die Autokorrelationsfunktion der Lichtquelle, die axiale Punktantwort des optischen Kohärenzmikroskops oder bei Blockade des Referenzarms die konfokale axiale Punktbildfunktion aufgenommen und gespeichert werden.

Diese Funktionen sind über das Menü *Operation* zugänglich.

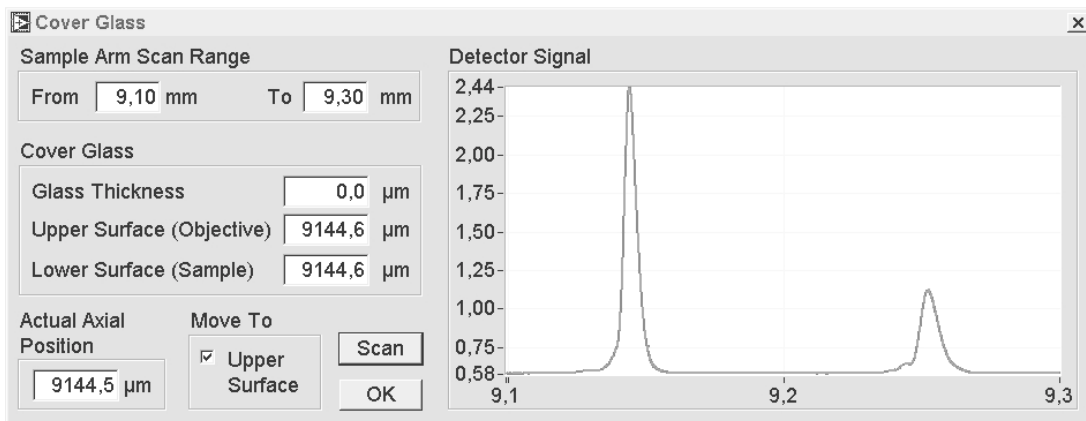
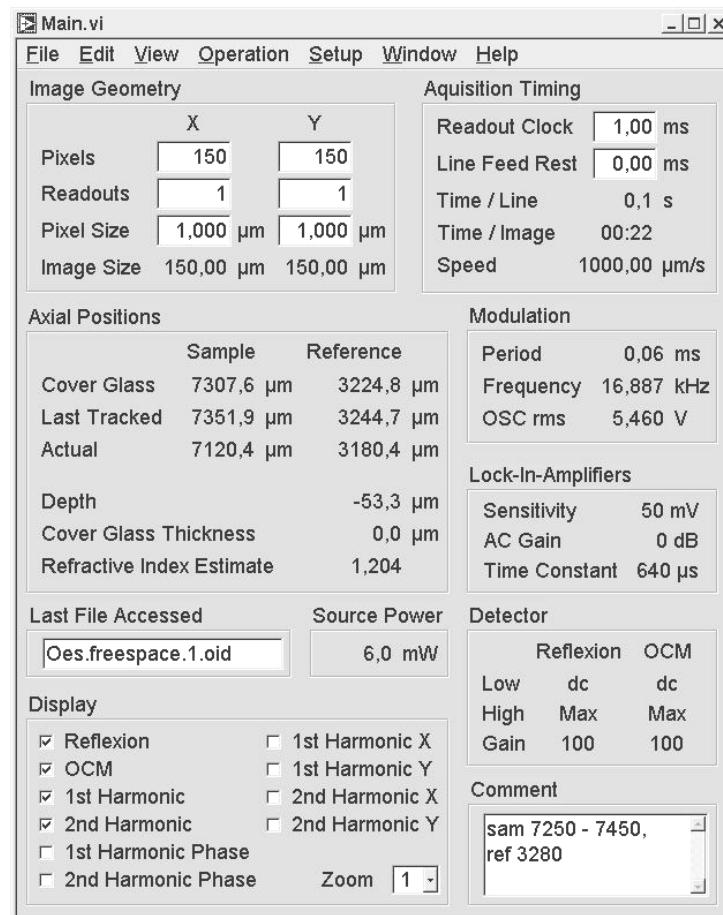


Abbildung B.6 Beispiele zur graphischen Benutzeroberfläche der Steuerungs- und Auswertungssoftware. *Oben:* Das Hauptfenster zeigt alle Parameter zu einem aufgenommenen Bild Datensatz an und erlaubt verschiedene Visualisierungen der Bilddaten. *Unten:* Autofokusfunktion. Durch Bewegung des Probenarmmotors wird die Bildebene durch die Probe gefahren. In diesem Fall ist die Probe ein Deckglas. Meßergebnisse solcher Justage-Hilfsprogramme werden immer innerhalb eines modalen Dialogfensters am Bildschirm dargestellt und auch temporär gespeichert.

Instrumentensteuerung und Parametereinstellung

Mit Ausnahme der Lock-In-Verstärker werden alle Geräte durch die Software ferngesteuert. Prinzipiell ließen sich mit einer zusätzlichen seriellen Schnittstelle auch die Lock-In-Verstärker konfigurieren. Die Parameter, die Bildgeometrie und -aufnahmedauer festlegen, werden im Hauptfenster eingestellt. Den übrigen Parametern werden die Werte in der Regel automatisch als Ergebnis der Initialisierung oder der Meßprogramme zugewiesen. Nur die Parameter der Lock-In-Verstärker müssen am Gerät eingestellt und für eine korrekte Dokumentation manuell eingetragen werden.

Aufgenommene Kanäle

Bei der Aufnahme eines Reflexionsmikroskopiebildes wird als einziger Kanal die Intensität I_{ref} aufgenommen. Für ein Bild der optischen Kohärenzmikroskopie werden vier Kanäle aufgezeichnet, nämlich die Komponenten \mathcal{H}_{1X} , \mathcal{H}_{1Y} , \mathcal{H}_{2X} und \mathcal{H}_{2Y} der Harmonischen aus den Lock-In-Verstärkern. Jeder Kanal ist eine Matrix, deren reellwertige Elemente Spannungswerte repräsentierten.

Dokumentation

Um die optische Kohärenzmikroskopie mit der konventionellen, konfokalen Reflexionsmikroskopie bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit vergleichen zu können, wird oftmals von demselben Objekt ein Reflexionsmikroskopiebild bei blockiertem Referenzarm und ein Kohärenzmikroskopiebild bei offenem Referenzarm aufgenommen. Daher werden in einem Bilddatensatz alle fünf Kanäle gespeichert. Zusätzlich sind in einem solchen Datensatz alle Parameter und ein Kommentar enthalten. Damit ist ein weitgehend automatisiertes, elektronisches Laborbuch realisiert, welches einen bei der Untersuchung frisch resezierter Gewebeproben wichtigen Zeitvorteil birgt. Eine übersichtliche Zusammenfassung kann ausgedruckt werden. Einzelne Kanäle oder Ergebnisse binärer Kanaloperationen können im ASCII- und TIF-Format exportiert werden.

Analysewerkzeuge und integrierter Farbkennlinieneditor

Um bereits während der Mikroskopiesitzung die aufgenommenen Bilddaten bewerten zu können und dadurch die Meßstrategie oder die Parameterwahl anpassen zu können, wurden verschiedene Funktionen zur Bildanalyse implementiert. Die Bilder der fünf Kanäle I_{ref} , \mathcal{H}_{1X} , \mathcal{H}_{1Y} , \mathcal{H}_{2X} und \mathcal{H}_{2Y} können zu den Bildern I_{OCM} , \mathcal{H}_1 , \mathcal{H}_2 , $\arctan(\mathcal{H}_{1Y}/\mathcal{H}_{1X})$ und $\arctan(\mathcal{H}_{2X}/\mathcal{H}_{2Y})$ kombiniert werden. Sowohl die Bilder zu den fünf Kanälen als auch die genannten Kombinationsbilder können mit wählbaren digitalen Vergrößerungen und voneinander unabhängigen Farbkennlinien angezeigt werden. Ein Farbkennlinieneditor wurde entwickelt, um die Bilder mit speicherbaren Farbkennlinien zu versehen, deren begrenzende Intensitäten exakt quantifiziert werden können (*clipping*). TIF-Exporte greifen auf die jeweilige Farbkennlinie zurück.

Die Farbkennlinien für die einzelnen Bildarten werden über das Menü *View* eingestellt. Ferner ist es über das Menü *Edit* unter anderem möglich, den F -Parameter (Abschnitt 3.1.6) unter visueller Kontrolle des resultierenden Bildes I_{OCM} interaktiv einzustellen oder beliebige Bilder horizontal oder vertikal zu projizieren.

B.1.6 Detailansicht des Interferometers

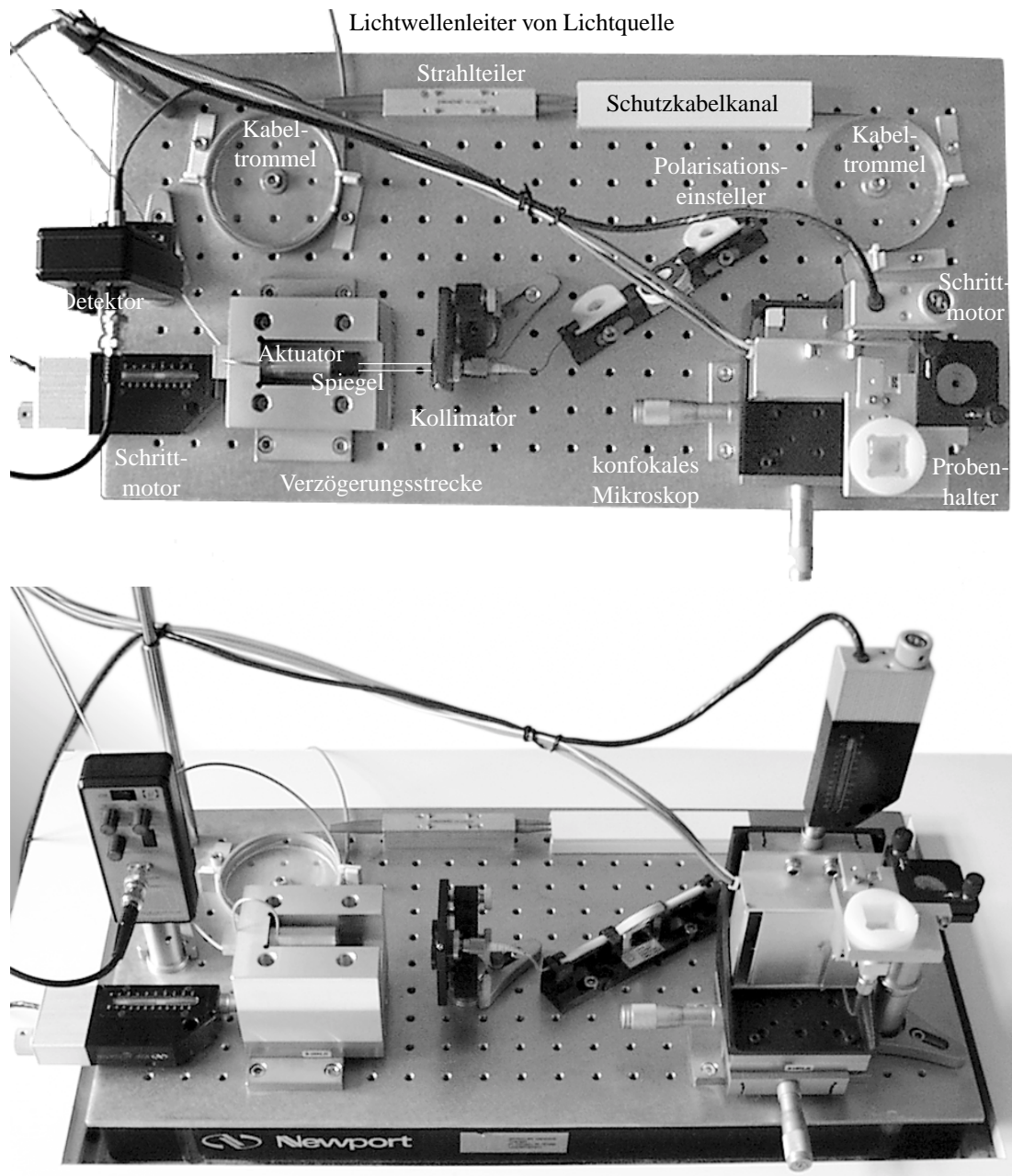


Abbildung B.7 Detailansicht der Komponenten des Interferometers auf der optischen Tischplatte des Gesamtsystems (Abbildung 3.2).

B.2 Elektrooptische Phasenmodulation

Unter Verwendung der endoluminal einsetzbaren Sonde (Abschnitt 5.2.1) muß die für die optische Kohärenzmikroskopie erforderliche Phasenmodulation im Referenzarm mit einer Frequenz in der Größenordnung von 10 MHz (Abschnitt 5.2.2) erfolgen. Weil derart hohe Frequenzen mit einem piezoelektrischen Aktuator nicht zu erreichen sind, soll ein elektrooptischer Phasenmodulator zum Einsatz kommen. Nachfolgend wird dessen Funktionsprinzip erläutert. Darauf aufbauend werden die Anforderungen an Ansteuerung und Justage erarbeitet. Abschließend wird eine Möglichkeit zur Realisierung eines resonant betriebenen elektrooptischen Phasenmodulators aufgezeigt.

B.2.1 Elektrooptischer Effekt

Als elektrooptischen Effekt (Hecht 1999d; Weber 1993) bezeichnet man die Induzierung von Doppelbrechung in einem Medium durch das Anlegen einer elektrischen Spannung. Man unterscheidet zwischen dem quadratischen und dem linearen elektrooptischen Effekt. Der quadratische elektrooptische Effekt oder KERR-Effekt tritt in Flüssigkeiten oder Kristallen auf und wird auf eine teilweise Ausrichtung von anisotropen Molekülen zurückgeführt. Er ist dem Quadrat der angelegten elektrischen Feldstärke proportional. Der lineare elektrooptische Effekt oder POCKELS-Effekt wird in Kristallen beobachtet. Bei ihm hängt die Brechungsindexänderung linear mit der angelegten elektrischen Feldstärke zusammen. Er tritt potentiell dann auf, wenn der Kristall kein punktförmiges Symmetriezentrum besitzt. Beide elektrooptischen Effekte erlauben Modulationen des Brechungsindex bis 10^{10} Hz.

Der Brechungsindex in einem anisotropen Kristall wird durch ein Brechungsindexellipsoid beschrieben. Dessen Halbachsen fallen mit den drei Hauptachsen des Kristalls zusammen. Die Länge einer Halbachse gibt den Brechungsindex entlang der zugehörigen Hauptachse an. Das Ellipsoid ändert sich beim Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes \mathbf{E} gemäß

$$\frac{x^2}{n_x^2} + \frac{y^2}{n_y^2} + \frac{z^2}{n_z^2} + \begin{pmatrix} x^2 & y^2 & z^2 & 2yz & 2xz & 2xy \end{pmatrix} \mathbf{r} \mathbf{E} = 1. \quad (\text{B.4})$$

Dabei ist der elektrooptische Tensor \mathbf{r} eine 6×3 -Matrix. Seine Elemente r_{ij} haben die Dimension m/V und geben die Stärke der durch den elektrooptischen Effekt induzierten optischen Weglängenänderung an. Die drei letzten Einträge der 1×6 -Matrix sind erforderlich, weil auch eine Drehung des Indexellipsoides, die durch Einwirkung des elektrischen Feldes entstehen kann, beschrieben werden muß.

Die optische Klassifikation von Kristallen (Born u. a. 1993; Weber 1993) beruht auf den Symmetrieeigenschaften ihrer Kristallstruktur, aufgrund derer man sie in optisch isotrop, einachsige oder zweiachsige einteilt. Optisch isotrope Kristalle haben ein punktförmiges Symmetriezentrum, so daß der Brechungsindex $n_o = n_x = n_y = n_z$ richtungsunabhängig ist. Einachsige Kristalle wie Lithiumniobat (LiNbO_3) zeigen eine

Symmetrie ihres optischen Verhaltens bezüglich einer einzigen drei- oder höherzähligen Hauptachse, die nach Konvention die z -Achse ist und als optische Achse des Kristalls definiert wird. Dann ist $n_o = n_x = n_y$ der Brechungsindex für die ordentliche Polarisationsrichtung und $n_z = n_e$ der Brechungsindex der außerordentlichen Polarisationsrichtung. Bei zweiachsigen Kristallen ist die Symmetrie geringer und n_x , n_y und n_z sind paarweise voneinander verschieden.

B.2.2 Modulatoren

Ein Kristall kann unter Ausnutzung des elektrooptischen Effekts dazu herangezogen werden, einen Lichtstrahl in seiner Intensität oder Phase zu modulieren. Der Kristall wird nachfolgend als Quader der Länge L mit quadratischen Stirnflächen der Kantenlänge d angenommen. Im longitudinalen Betrieb liegen die Elektroden, an die die modulierende Spannung angelegt wird, auf den für den Lichtein- und austritt vorgesehenen Stirnflächen des Kristalls. Liegen die Elektroden dagegen seitlich, also parallel zum Lichtstrahl, spricht man von transversalem Betrieb des Modulators. Unabhängig von der Betriebsart empfiehlt es sich, die Spannung immer in Richtung der Achse anzulegen, entlang der der elektrooptische Effekt am stärksten ist. Für LiNbO_3 ist dies die optische Achse, da r_{33} deutlich größer ist als die übrigen Elemente des elektrooptischen Tensors.

Bei einem longitudinal betriebenen Modulator entsteht keine Phasenverschiebung zwischen den beiden Polarisationsrichtungen des einfallenden Lichts, transversal dagegen schon. Daher benötigt ein transversal betriebener Phasenmodulator am Eingang linear polarisiertes Licht, wobei die Polarisationsrichtung parallel zu der Richtung des elektrischen Feldes liegen muß. Bei einem transversal betriebenen Intensitätsmodulator würde man dagegen die Polarisationsrichtung des einfallenden Lichtes um 45° drehen, um durch Anlegen einer Spannung eine Drehung der Polarisationsrichtung zu erreichen und so mittels eines nachgeschalteten Analysators die Intensität modulieren zu können.

Um bei einem transversal betriebenen Phasenmodulator eine Intensitätsmodulation zu verhindern, ist also linear polarisiertes Licht erforderlich. Dessen Polarisationsrichtung, die Strahleinfallsrichtung und die Kristallachsen müssen passend zueinander justiert sein.

Bei Anlegen einer Spannung verhält sich der Kristall wie ein Kondensator. Im transversalen Betrieb kann man die für eine bestimmte Modulationsamplitude A_{mod} aufzuwendende Spannungsamplitude U_{crystal} durch ein kleines Aspektverhältnis d/L des Kristalls verringern. Für große Strahlaperturen ist jedoch die Bandbreite begrenzt (Abschnitt B.2.3). Im longitudinalen Betrieb dagegen ist die aufzuwendende Spannungsamplitude unabhängig von der Strahlapertur, allerdings benötigt man generell hohe Spannungen und transparente Elektroden.

B.2.3 Transversal betriebener Phasenmodulator

Im Laboraufbau beträgt die Apertur des offenen Strahls im Referenzarm nur etwa 3 mm (Abschnitt 3.1.5), weshalb sich für den dort einzubringenden elektrooptischen Phasenmodulator ein transversaler Betrieb anbietet. Es wird nun berechnet, welche Amplitude U_{crystal} der am elektrooptischen Kristall anliegenden Wechselspannung benötigt wird, um die nach Gleichung (2.45) erforderliche Amplitude der Phasenmodulation von $A_{\text{mod}} \approx 0,20928\lambda_0 \approx 274 \text{ nm}$ zu erreichen.

Im transversalen Betrieb ist $\mathbf{E} = (0 \ 0 \ E)$, und aufgrund der Symmetrieeigenschaften des LiNbO₃-Kristalls vereinfacht sich der elektrooptische Tensor (Yariv 1997), so daß ausgehend von Gleichung (B.4)

$$\frac{x^2}{n_o^2} + \frac{y^2}{n_o^2} + \frac{z^2}{n_e^2} + \begin{pmatrix} x^2 \\ y^2 \\ z^2 \\ 2yz \\ 2xz \\ 2xy \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} 0 & -r_{22} & r_{13} \\ 0 & r_{22} & r_{13} \\ 0 & 0 & r_{33} \\ 0 & r_{51} & 0 \\ r_{51} & 0 & 0 \\ -r_{22} & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ E \end{pmatrix} = 1 \quad (\text{B.5})$$

gilt, was sich zu

$$x^2 \left(\frac{1}{n_o^2} + r_{13}E \right) + y^2 \left(\frac{1}{n_o^2} + r_{13}E \right) + z^2 \left(\frac{1}{n_e^2} + r_{33}E \right) = 1 \quad (\text{B.6})$$

vereinfacht. In der longitudinalen Konfiguration wäre der Schnitt durch das Zentrum des Index-Ellipsoids senkrecht zum Wellenzahlvektor ein Kreis mit Radius $(1/n_o^2 + r_{13}E)^{-1/2}$, und beide Polarisationsrichtungen erführen dieselbe Verzögerung. In der transversalen Konfiguration dagegen ist die Schnittfläche eine Ellipse mit den Halbachsenlängen $(1/n_o^2 + r_{13}E)^{-1/2}$ und $(1/n_e^2 + r_{33}E)^{-1/2}$, so daß eine Drehung der Polarisationsrichtung möglich wird. Zur reinen Phasenmodulation muß die Polarisationsrichtung des zu modulierenden Lichts also koplanar mit einer der Kristallachsen sein, idealerweise mit der z -Achse, weil dann wegen $r_{33} > r_{13}$ eine geringere Spannung ausreicht. Die induzierte Brechungsindexänderung ist dann²

$$\Delta n = n_e - \frac{1}{\sqrt{1/n_e^2 + r_{33}E}} \approx \frac{n_e^3 r_{33} E}{2}. \quad (\text{B.7})$$

Das Licht erfährt beim Passieren des Kristalls die optische Weglängenänderung $\Gamma = L \Delta n = L n_e^3 r_{33} E / 2$. Ersetzt man $E = U/d$ und löst nach U auf, so resultiert die Spannung

$$U = \frac{2}{n_e^3 r_{33}} \frac{d}{L} \Gamma, \quad (\text{B.8})$$

die an den Kristallelektroden angelegt werden muß, um einen optischen Weglängenunterschied Γ zu induzieren. Die Kapazität des Kristalls beträgt³

$$C_{\text{crystal}} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{Ld}{d} = \varepsilon_0 \varepsilon_r L. \quad (\text{B.9})$$

²Für $\varepsilon \ll 1$ gilt $1 - (1 + \varepsilon)^{-1/2} \approx \varepsilon/2$.

³ $\varepsilon_0 = 8,854210^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$

Aufgrund der gegebenen Strahlapertur von 3 mm wurde für die quadratische Stirnfläche des Kristalls die Kantenlänge $d = 5$ mm gewählt. Um die mechanische Stabilität des Kristalls zu gewährleisten, wurde seine Länge auf $L = 6$ cm begrenzt. Für LiNbO_3 ist $n_e = 2,16$ und $r_{33} = 30,9 \text{ pm V}^{-1}$ (Deltronic Crystal Industries 2001). Bei jedem Passieren des Kristalls ist eine optische Weglängenänderung der Amplitude $\Gamma = A_{\text{mod}} = 274 \text{ nm}$ zu erreichen. Gemäß Gleichung (B.8) beträgt damit die Amplitude der an den Kristall anzulegenden Wechselspannung $U_{\text{crystal}} = 147 \text{ V}$. Die Kristallkapazität beträgt nach Gleichung (B.9) theoretisch $C_{\text{crystal}} \approx 16 \text{ pF}$. Mit einem Meßgerät (ELV Elektronik, Bausatz LCR 2100) wurde die Kapazität zu $(26 \pm 1) \text{ pF}$ bestimmt, wobei in diesem Wert auch Leitungs- und Streukapazitäten enthalten sein können.

B.2.4 Serienschwingkreis zur Ansteuerung des Kristalls

Im Fall der Phasenmodulation mittels des Piezoaktuators (Abschnitt 3.1.5) lag die Amplitude U_{mod} der Steuerspannung direkt am Piezoaktor an. Bei der elektrooptischen Phasenmodulation wäre es vorteilhaft, wenn die Amplitude $U_{\text{crystal}} = 147 \text{ V}$ der am Kristall anliegenden Wechselspannung nicht direkt von der Steuerspannungsquelle erzeugt werden muß. Wie nachfolgend dargelegt wird, gelingt es mittels einer passiven Impedanztransformation in Form eines resonanten Serienschwingkreises, die benötigte Ausgangsspannung und -leistung des Funktionsgenerators um mehr als eine Größenordnung zu reduzieren.

Zum Betrieb des elektrooptischen Phasenmodulators muß die Summe $C_{\text{mod}} \approx 150 \text{ pF}$ aus der Kristallkapazität C_{crystal} und sämtlichen parasitären Leitungs- und Streukapazitäten⁴ mit der Modulationsfrequenz $\nu_{\text{mod}} = 10 \text{ MHz}$ umgeladen werden. Der dabei entstehende Scheinwechselstrom der Amplitude $I_{\text{mod}} = \omega_{\text{mod}} C_{\text{mod}} U_{\text{crystal}}$ muß ohmsche Widerstände der Gesamtgröße R_{mod} überwinden. Die Spannungsquelle muß daher die Leistung

$$P_{\text{mod}} = I_{\text{mod}}^2 R_{\text{mod}} / 2 = (\omega_{\text{mod}} C_{\text{mod}} U_{\text{crystal}})^2 R_{\text{mod}} / 2 \quad (\text{B.10})$$

zur Verfügung stellen. Würde man den Kristall direkt an eine Spannungsquelle anschließen (Abbildung B.8 *links*), so wäre der ohmsche Widerstand primär durch deren Innenwiderstand R_{in} gegeben. Bei $R_{\text{in}} = 50 \Omega$ wäre $P_{\text{mod}} = 1,2 \text{ W}$. Hochfrequenzgeneratoren dieser Leistungsklasse sind aufwendig und entsprechend teuer. Beispielsweise leistet der Funktionsgenerator⁵, der zum Betrieb der piezoelektrischen Phasenmodulation herangezogen wurde, bei mittlerer Belastung nur gut 70 mW.

Um den elektrooptischen Phasenmodulator dennoch mit einem Funktionsgenerator betreiben zu können, muß daher der Innenwiderstand der Spannungsquelle von den Verlusten auf den unmittelbaren Zuleitungen zum Kristall entkoppelt werden. Dies kann

⁴Die Größe der parasitären Leitungs- und Streukapazitäten konnte im Zuge der in diesem Abschnitt beschriebenen Entwicklung eines Schwingkreises aufgrund von gemessenen Resonanzfrequenzen dieses Schwingkreises abgeschätzt werden. Bei sauberen Lötarbeiten betrug C_{mod} nie weniger als 120 pF.

⁵Hewlett-Packard 33120A. Der Funktionsgenerator liefert bei einer Ausgangsimpedanz von 50Ω maximal $U_{\text{mod}} = 10 \text{ V}$, was einer Leistung von 141 mW entspricht.

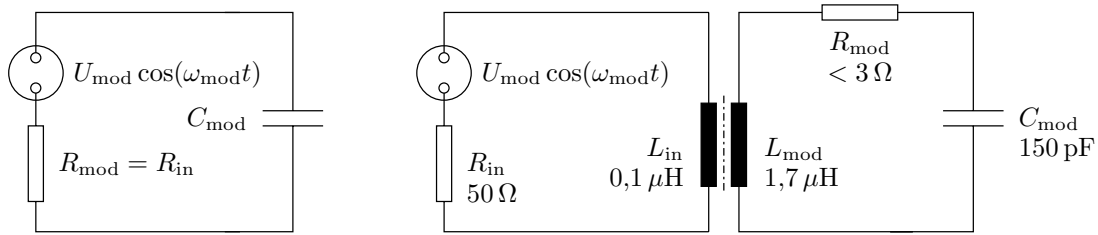


Abbildung B.8 Ansteuerung des elektrooptischen Phasenmodulators. *Links:* Bei statischer Ansteuerung des Kristalls der Kapazität C_{mod} fließt der Lade- und Entladestrom durch den Innenwiderstand der Spannungsquelle. *Rechts:* Entkopplung des Innenwiderstandes der Spannungsquelle von der Kapazität mittels eines induktiven Übertragers. Die Resonanzfrequenz des Serienschwingkreises stimmt mit der gewünschten Modulationsfrequenz überein.

mittels eines induktiven Übertragers geschehen (Abbildung B.8 *rechts*). Dessen eingangsseitige Induktivität L_{in} wird mit der Spannungsquelle verbunden, und seine ausgangsseitige Induktivität L_{mod} ist Teil eines Serienschwingkreises. Der Serienschwingkreis besteht aus der Induktivität L_{mod} , der Kapazität C_{mod} und einem ohmschen Widerstand R_{mod} , der auch die Wirbelstromverluste im Kern des Übertragers enthält. In dieser Konfiguration gleicht der Funktionsgenerator nur noch die Verluste durch R_{mod} aus, während der Serienschwingkreis resonant betrieben wird.

Geht man davon aus, daß im Schwingkreis nur die vorgenannte Leistung von 70 mW verbraucht werden darf, so darf R_{mod} gemäß Gleichung (B.10) die obere Grenze von 3Ω nicht überschreiten. Der Widerstand der Leitungen ist vernachlässigbar, allerdings muß der Spulenkern bei 10 MHz ebenfalls mit sehr geringen Wirbelstromverlusten arbeiten. Daher wird für dem Übertrager das Kernmaterial K1 (Epcos AG) verwendet. Ferner muß das Verhältnis $L_{\text{in}}/L_{\text{mod}}$ hinreichend klein sein, damit der Stromfluß durch den Innenwiderstand des Funktionsgenerators gering bleibt.

Angesichts des geringen Wertes, der für R_{mod} zulässig ist, kann die Resonanzkreisfrequenz genähert⁶ werden als $\omega_{\text{mod}} \approx (L_{\text{mod}} C_{\text{mod}})^{-1/2}$. Mit der Modulationsfrequenz $\omega_{\text{mod}}/2\pi = 10 \text{ MHz}$ wird dann $L_{\text{mod}} = 1,7 \mu\text{H}$. Diese Induktivität ist bei dem verwendeten Kern (Epcos AG, Kern B65531D0025A001) durch 8 Wicklungen zu erreichen. Eingangsseitig werden 2 Wicklungen gewickelt, so daß $L_{\text{in}} = L_{\text{mod}}/16 = 0,1 \mu\text{H}$. Folglich fließt durch den Innenwiderstand der Spannungsquelle nur 1/16 des Stroms im Schwingkreis.

Der Gütefaktor $Q = (L_{\text{mod}}/C_{\text{mod}})^{1/2}/R_{\text{mod}}$ eines Serienschwingkreises charakterisiert einerseits die resonante Überhöhung $Q(1 - (2Q)^{-2})^{-1/2} \approx Q$ für $Q > 5$ der Kondensatorspannung⁷ im Vergleich zum quasistatischen Niveau, und andererseits die Halbwertsbreite $\Delta\omega = \omega_0/Q$ der Resonanzkurve (Gerthsen und Vogel 1993). Im vorliegenden Fall ist $Q = 35,5$. Bei mittlerer Belastung des Funktionsgenerators beträgt

⁶Die Resonanzkreisfrequenz ω_0 eines RLC -Serienschwingkreises ist exakt durch die Beziehung $\omega_0^2 = (1/LC) - (R/2L)^2$ gegeben (Gerthsen und Vogel 1993).

⁷Beim Vergleich zwischen angeregten Schwingungen mechanischer und elektromagnetischer Art entspricht die mechanische Auslenkung der Kondensatorladung.

dessen Ausgangsspannungsamplitude $U_0 = 5 \text{ V}$. Dann resultiert eine Spannungsamplitude am Kristall von $U_{\text{crystal}} = Q U_{\text{mod}} = 177 \text{ V}$. Demnach müßte die Leistung des Funktionsgenerators ausreichen, um die erforderliche Amplitude von $U_{\text{crystal}} = 147 \text{ V}$ zu erreichen. Die Halbwertsbreite der Resonanzkurve beträgt $\Delta\nu = 0,3 \text{ MHz}$ und ist daher breit genug, damit die Spannungsamplitude am Kristall nicht zu sehr durch temperaturbedingte Resonanzdriften beeinflusst wird.

Die erarbeiteten Kenngrößen von Kristall, Übertrager und Serienschwingkreis sollten demnach ausreichen, um mittels eines Funktionsgenerators die für die optische Kohärenzmikroskopie erforderliche Amplitude der Phasenmodulation zu erreichen.

B.2.5 Justagestrategie

Die bei der elektrooptischen Phasenmodulation prinzipiell involvierten Komponenten des Referenzarms sind der Kollimator, ein Polarisator, der die Phase modulierende Kristall und ein Spiegel. Diese vier Komponenten müssen korrekt aufeinander ausgerichtet sein, damit es nicht zur Intensitätsmodulation des Lichtstrahls kommt.

Daher wurde der Kristall auf seiner dem Kollimator zugewandten Stirnfläche anti-reflexbeschichtet und auf der gegenüberliegenden Stirnfläche hochreflektierend beschichtet. Damit sind Kristall und Spiegel richtig zueinander justiert. Der Kristall wird auf einer Vorrichtung (New Focus 9082) montiert, die es erlaubt, die laterale Position jeder Stirnfläche relativ zur optischen Achse zu verschieben, ohne die Position der jeweils anderen Stirnfläche wesentlich zu verändern.

Auf diese Weise kann der Kristall bei ausgebautem Polarisator auf die optische Achse des Kollimators ausgerichtet werden, indem die detektierte Lichtleistung maximiert wird. Anschließend kann der Polarisator eingesetzt werden und ebenfalls durch Maximierung der Lichtleistung justiert werden. Abschließend wird die Polarisationsrichtung des durch den Polarisator transmittierten Lichts so gedreht, daß sie parallel zu dem elektrischen Feld zwischen den Kristallelektroden liegt.

B.2.6 Quasistatische Phasenmodulation und Seitenbänder

Wird die Phase im Referenzarm mit einem piezoelektrisch bewegten Spiegel moduliert, wirkt die Phasenänderung nahezu instantan auf das Licht. Bei Verwendung des elektrooptischen Modulators dagegen muß gegebenenfalls die Laufzeit des Lichts für den Hin- und Rückweg durch den Kristall der Länge L berücksichtigt werden, weil sich der Brechungsindex des Kristalls zwischen dem Ein- und Austritt einer Wellenfront ändert. Dies führt dazu, daß die Phase nicht mehr harmonisch moduliert wird.

Denn sei zu einem Zeitpunkt t die am Kristall anliegende Wechselspannung extremal und sei ferner t_{crystal} die Zeit, die eine Welle zum Durchlaufen des Kristalls benötigt. Dann ist die Phasenverzögerung für die Wellenfront extremal, die zum Zeitpunkt $t - t_{\text{crystal}}/2$ in den Kristall eintritt. Wellenfronten, die zu den Zeitpunkten

$t - t_{\text{crystal}}$ oder t eintreten, erfahren eine geringere aber untereinander gleich große Phasenverzögerung. Folglich sind aufgrund der Laufzeit durch den Kristall die resultierenden maximalen und minimalen Phasenverzögerungen jeweils geringer oder größer, als dies bei einer statischen Spannung der Fall wäre. Ferner sind die Extremstellen der Phasenverzögerung zeitlich gegenüber dem Spannungsverlauf verschoben, und die resultierende Phasenverzögerung ist nicht mehr rein harmonisch.

Für den zu verwendenden LiNbO₃-Kristall der Länge $L = 6$ cm und die Modulationsfrequenz $\nu_{\text{mod}} = 10$ MHz können diese Effekte jedoch vernachlässigt werden. Denn das Licht benötigt zum Durchlaufen des Kristalls die Zeit $t_{\text{crystal}} = 2L n_e/c = 2 \cdot 0,06 \text{ m} \cdot 2,16 / (3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}) = 8,64 \cdot 10^{-10} \text{ s}$. Dagegen dauert ein Modulationszyklus $T_{\text{mod}} = 10^{-7} \text{ s} = 116 t_{\text{crystal}}$. Damit dreht sich die Phase der Modulation während der Passage einer Wellenfront durch den Kristall nur um $360^\circ t_{\text{crystal}}/T_{\text{mod}} = 3,1^\circ$. Insofern kann die Phasenmodulation als quasistatisch angenommen werden.

Phasen- und Frequenzmodulation können nicht streng voneinander getrennt werden (Meschede 1999). Denn abhängig von der Modulationsamplitude entstehen im Frequenzspektrum einer phasenmodulierten Welle Seitenbänder, deren Frequenzen um ganzzahlige Vielfache der Modulationsfrequenz von der Grundfrequenz der Welle abweichen. Kann man die in den Seitenbändern übertragene Leistung im Vergleich zu der bei der Grundfrequenz übertragenen Leistung vernachlässigen, spricht man von Phasenmodulation, anderenfalls von Frequenzmodulation⁸. Bei der gemäß Gleichung (2.45) erforderlichen Modulationsamplitude $A_{\text{mod}} \approx 0,20928\lambda_0$ übertragen aber nur wenige⁹ Seitenbänder Leistung. Angesichts des großen Verhältnisses zwischen Lichtfrequenz $c/\lambda_0 = 2,3 \cdot 10^{14} \text{ Hz}$ und Modulationsfrequenz 10^7 Hz liegen die Seitenbänder in unmittelbarer Umgebung der Grundlichtfrequenz, weshalb sie die Interferenz im Detektionsarm nicht beeinflussen.

⁸Phasenmodulation liegt für Modulationsamplituden A_{mod} mit $2k_0 A_{\text{mod}} < 1$ vor, Frequenzmodulation bei Modulationsamplituden mit $2k_0 A_{\text{mod}} \geq 1$ (Meschede 1999).

⁹Für $2k_0 A_{\text{mod}} = 2,4$ sind primär nur die acht Seitenbänder betroffen, die symmetrisch um die Grundfrequenz liegen (Meschede 1999). Dieser Fall ist vergleichbar mit der bei dem optischen Kohärenzmikroskop erforderlichen Modulationsamplitude, denn bei $A_{\text{mod}} \approx 0,20928\lambda_0$ beträgt $2k_0 A_{\text{mod}} = 2,6$.

Anhang C

Medizinisches Umfeld

Hier werden medizinische Aspekte zusammengestellt, die zum Verständnis der klinischen Bedeutung der endoluminalen Mikroskopie für die Diagnose von Neubildungen und deren Vorstufen dienen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den Hohlorganen des Verdauungstrakts. Es wird kein Anspruch auf eine vollständige oder ausgewogene Darstellung erhoben, und es werden bevorzugt Themen angesprochen, die die Einordnung der Ergebnisse der Kapitel 3 bis 5 unterstützen.

C.1 Anatomie der Hohlorgane des Verdauungstrakts

Die Wände der Hohlorgane des Verdauungstrakts bestehen aus mehreren Schichten (Abbildung C.1), deren Abfolge bei den verschiedenen Organen anatomisch vergleichbar ist. Je nach Funktion des Organes fallen diese Schichten unterschiedlich aus. Traditionell erfolgt eine Gruppierung in Mucosa, Submucosa, Muscularis externa und Tunica adventitia. Die innerste, an das Lumen grenzende Schicht ist die Mucosa. Sie selbst besteht von innen nach außen aus Epithel, Lamina propria mucosae und Muscularis mucosae. Das Epithel ist als Schleimhaut mit Drüsen ausgestattet. Die Lamina propria mucosae besteht aus Bindegewebe und ist mit Gefäßen und Nerven durchzogen. Die Muscularis mucosae ist eine dünne Schicht aus Muskelzellen¹. Unterhalb der Mucosa befindet sich die Submucosa. Sie ist eine Bindegewebsschicht, die die Verschiebbarkeit zwischen Mucosa und Muscularis externa ermöglicht. Die darunterliegende Muscularis externa besteht aus einer inneren Ringmuskulatur und einer äußeren Längsmuskulatur. Die Tunica adventitia begrenzt das Organ und erlaubt seine Verschiebbarkeit relativ zu seiner Umgebung.

Die Wand des Ösophagus ist innen mit unverhorntem Plattenepithel ausgekleidet. Seine Oberfläche ist glatt und leicht in Richtung des Ösophagusverlaufs gefaltet. Im Öso-

¹Ähnlich wie die Muscularis externa ist diese auch innen zirkular und außen longitudinal strukturiert. Sie ist mutmaßlich für Kontraktionen der Drüsen zu deren Entleerung verantwortlich (Bloom und Fawcett 1975).

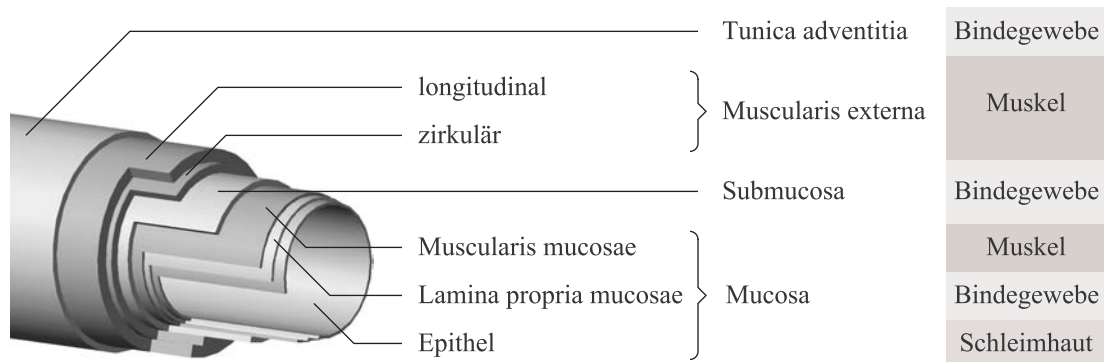


Abbildung C.1 Laminarer Aufbau der Wände der Hohlorgane des Verdauungstrakts. Die Tunica adventitia kann nach außen zusätzlich eine Plattenepithelschicht enthalten. Die in der Medizin übliche Einteilung in vier Hauptschichten erscheint dem Laien anatomisch nicht besonders logisch. Zwar stellt die Mucosa eine funktionale Einheit dar, allerdings geht dabei verloren, daß die Organwand sehr einfach als Epithel und zwei Muskelschichten, die alle jeweils durch Bindegewebe getrennt sind, kategorisiert werden könnte.

phagus gibt es bis in die Submucosa reichende Drüsen, die einen Schleim zum Schutz der Epitheloberfläche absondern. Diese Drüsen sind jedoch nicht von besonderer Relevanz bei histopathologischen Fragestellungen. Das Plattenepithel des Ösophagus erscheint als homogene, kompakte Schichtung von Zellen aus bis zu etwa 50 Lagen Zellen (Pschyrembel 1982b).

Die Organe, in denen sich die Nahrung über längere Zeit aufhält, sind dagegen mit dem drüsenreichen Zylinderepithel versehen. Den Beginn der Auskleidung mit Zylinderepithel markiert die zickzackförmige Z-Linie innerhalb der in der gastro-ösophagealen Übergangszone am unteren Ende des Ösophagus. Die Drüsen werden auch als Krypten bezeichnet und stellen meist kegelförmige Vertiefungen dar. Das Epithel umfaßt nur wenige Lagen Zellen, so daß sich bereits in geringer Tiefe zwischen zwei Drüsen das Bindegewebe der Lamina propria mucosae befindet. Die Geometrie der Drüsen, ihre Packungsdichte und die in ihrem Epithel enthaltenen Zelltypen sind die wesentlichen Merkmale zur Unterscheidung der Epithelien verschiedener Verdauungsorgane.

C.2 Neubildungen

Bösartige Neubildungen – umgangssprachlich als Krebs bezeichnet – sind in den westlichen Industrienationen und Japan eine der Haupttodesursachen. Die Weiterentwicklung von Diagnose- und Therapietechniken hat daher besondere ethische und makroökonomische Bedeutung. Die Überlebensrate ist bei frühzeitiger Erkennung besonders hoch. Daher ist die Gesundheitspolitik zur Reduktion der Mortalität primär auf Früherkennungsprogramme angewiesen. Gleichzeitig sind jedoch gerade die Frühstadien schwer diagnostizierbar. Hierdurch steigen die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der zur Verfügung stehenden Diagnoseverfahren.

Todesursache	Klassifikation nach ICD 10	Sterbefälle	
		[1/10 ⁵]	[%]
Alle Krankheiten und Folgen äußerer Ursachen	A00 – T98	1.031,0	100,0
Krankheiten des Kreislaufsystems	I00 – I99	494,7	48,0
Neubildungen	C00 – D48	263,5	25,6
Bösartige Neubildungen	C00 – C97	256,8	24,9
der Verdauungsorgane	C15 – C26	85,9	8,3
der Atmungsorgane und sonstiger intrathorakaler Organe	C30 – C39	48,5	4,7
der Brustdrüse	C50 – C50	21,7	2,1
Krankheiten des Atmungssystems	J00 – J99	62,7	6,1
Krankheiten des Verdauungssystems	K00 – K93	48,9	4,7
Verletzungen, Vergiftungen und bestimmte andere Folgen äußerer Ursachen	S00 – T98	41,5	4,0
Endokrine, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten	E00 – E90	28,4	2,8
Symptome und abnorme klinische und Laborbefunde, die anderenorts nicht klassifiziert sind	R00 – R99	27,5	2,7

Tabelle C.1 Sterbefälle in Deutschland klassifiziert nach Todesursachen gemäß ICD 10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, 10. Revision) für das Jahr 1999 (Statistisches Bundesamt 1999). Aufgeführt sind nur Kategorien und im Falle der bösartigen Neubildungen Unterkategorien, bei denen der Anteil der Sterbefälle mindestens 2% beträgt. Ausgehend von einer Bevölkerungszahl von $82 \cdot 10^6$ entfallen auf die bösartigen Neubildungen der Verdauungsorgane 70.766 Sterbefälle.

C.2.1 Prävalenz von Neubildungen der Verdauungsorgane

Nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems stehen gemäß Tabelle C.1 die bösartigen Neubildungen mit einem Anteil von 26% als Todesursache in Deutschland an zweiter Stelle. Die bösartigen Neubildungen der Verdauungsorgane haben dabei einen Anteil von 8,3% aller Sterbefälle, das sind gut 70.000 Sterbefälle. Sie sind demnach bedeutender als alle anderen² Erkrankungen der Verdauungsorgane zusammen. Folglich sind in den medizinischen Disziplinen, die sich mit der Diagnose und Therapie von Krankheiten des Verdauungstraktes beschäftigen, also in chirurgischer Endoskopie, Gastroenterologie und Viszeralchirurgie, die Erkennung und Therapie von Neubildungen das zentral diskutierte Thema.

²Die Krankheiten des Verdauungssystems sowie die endokrinen, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten summieren sich zu 7,5% aller Sterbefälle.

C.2.2 Neo-, Hyper-, Meta- und Dysplasien

Die Neoplasie bezeichnet die eigendynamische Neubildung von Gewebe im Sinne der Neubildungen aus Tabelle C.1. Je nach Grad dieser Eigendynamik spricht man von benignen oder malignen Neoplasien. Sie wird verursacht durch ein Umgehen der Apoptose³ und mehrfache Mutationen. Epitheliale Neoplasien werden als Karzinom bezeichnet.

Dagegen bezeichnet die Hyperplasie eine Zellvermehrung, die durch äußere Ursachen stimuliert wird und mit deren Wegfall endet. Bei der Metaplasie werden Zellen einer differenzierten⁴ Gewebeart in die einer anderen Gewebeart reversibel umgewandelt, üblicherweise streßinduziert, beispielsweise durch eine Entzündung.

Die Dysplasie bezeichnete eine abnormale Zellveränderung, die sich zurückbilden oder zur Neoplasie wandeln kann (Pschyrembel 1982c). Der Begriff ist mittlerweile hinfällig. Die Dysplasie wird nach der neueren WHO-Klassifikation als niedrig maligne Neoplasie benannt im Gegensatz zu der hochgradigen Neoplasie.

Neo-, Hyper-, Meta- und Dysplasie können unter dem Begriff der Läsion zusammengefaßt werden, der allgemein eine epitheliale Unregelmäßigkeit bezeichnet. Läsionen können ausgedehnt, fokal⁵ oder multifokal sein.

C.2.3 Klassifikation epithelialer Tumore

Tumore in den Verdauungsorganen haben ihren Ursprung meist im Epithel. Von dort breiten sie sich lateral oder axial aus. So unterscheidet man flache, abgesenkte oder hervorstehende Läsionen. Ihre Wachstumsrichtung und -geschwindigkeit bedingt die Malignität. Beispielsweise benötigen aus der Wand herauswachsende Neoplasien in der Regel länger als flache oder abgesenkte Neoplasien, bis sie die Submucosa infiltrieren und es zu der damit verbundenen erhöhten Metastasierungsgefahr kommt.

Für die Systematisierung der individuellen Therapie ist eine allgemeine Klassifikation der Tumore unabdingbar. Die Klassifikation umfaßt das *Staging* und das *Grading* (Tabelle C.2). Unter dem *Staging* einer Läsion versteht man die Einordnung ihrer makroskopischen Ausdehnung, speziell interessiert die laterale Ausdehnung und die Infiltration in bestimmte anatomische Schichten. Etabliert hat sich hierzu das TNM-System⁶. Beim *Grading* unterscheidet man den Differenzierungsgrad auf mikroskopischer Ebene. Für das *Grading* ist daher eine histologische Auswertung erforderlich.

³programmierter Zelltod

⁴Differenziertheit im pathologischen Sinn ist die strukturelle und funktionelle Angleichung von Tumorgewebe an das ursprüngliche Gewebe. (Hoffmann-La Roche AG 1999). Dabei liegen bei hochdifferenziertem Gewebe die Zellen regulär vor, während bei undifferenziertem Gewebe eine ausgeprägte Atypizität vorliegt.

⁵auf ein sehr kleines Areal beschränkt, also beinahe punktförmig

⁶Die Abkürzung zählt mit T, N und M die ersten drei Buchstaben auf, die zum Bilden der Klassifikationscodes beim *Staging* herangezogen werden (Tabelle C.2). Dennoch wird die Abkürzung allgemein bezüglich der Klassen für sowohl *Staging* als auch *Grading* verwendet, umfaßt also T, N, M, R und G.

<i>Staging</i>				<i>Grading</i>	
Ausdehnung des Primärtumors		regionale Lymphknotenmetastasen		Differenzierungsgrad	
TX	unbekannt	NX	unbekannt	GX	unbekannt
T0	kein	N0	keine		
Tis	Tumor <i>in situ</i>				
T1	Submucosa	N1	geringer Befall	G1	gut differenziert
T2	Muscularis externa	N2	mäßiger Befall	G2	mäßig differenziert
T3	Tunica adventitia	N3	starker Befall	G3	schlecht differenziert
T4	Nachbarorgane			G4	undifferenziert
Fernmetastasen		postoperativer Residualtumor			
MX	unbekannt				
M0	keine	R0	kein		
M1	vorhanden	R1	mikroskopisch		
		R2	makroskopisch		

Tabelle C.2 TNM-System (Pschyrembel 1982d) der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) zum *Staging* und *Grading* von Tumoren. Als Kriterium für die Einordnung in die Kategorien T0 bis T4 ist hier die laminare Infiltrationstiefe angegeben. Dies soll aber nur der Orientierung dienen, da die Kriterien meist organspezifisch von medizinischen Gesellschaften empfohlen werden und entsprechend uneinheitlich sind. Die Kategorie M1 kann durch Codes aus drei Großbuchstaben ergänzt werden, die den Ort der Fernmetastase angeben.

Hierzu wird eine Gewebeprobe entnommen, ein Dünnschnitt angefertigt, eingefärbt und im pathologischen Labor mikroskopiert. Die Dauer für diese Prozedur beträgt bei Gefrierschnitten ein bis zwei Stunden, normalerweise aber mindestens einen Tag.

C.3 Endoskopische Tumorerkennung

Die Diagnose von Krebs im Verdauungstrakt bedient sich der natürlichen Körperöffnungen zum Einführen abbildender oder bildgebender⁷ Instrumente. Sie beginnt mit der visuellen Lokalisation von verdächtigen Läsionen. Nach der Lokalisation müssen *Staging* und *Grading* mittels Biopsie erfolgen.

Den nach wie vor größten Stellenwert hat die konventionelle Endoskopie mit flexiblen oder, wo möglich, starren Systemen, die sich zur Darstellung meist der Videotechnik bedienen. Das Endoskopbild dient allein zur Lokalisation von Läsionen. Bei der

⁷Zwar gibt den neueren Ansatz der virtuellen Endoskopie, bei dem aus den Bilddaten eines Magnetresonanztomographen der Verdauungstrakt dreidimensional rekonstruiert und in der perspektivischen Sicht eines Endoskopes dargestellt wird (Rogalla u. a. 2000). Angesichts der geringen Auflösung der Tomographen können aber bislang nur Läsionen ab einem Durchmesser von etwa 3 mm registriert werden, so daß der Nutzen für die Früherkennung bezweifelt werden muß. Aufgrund der ausschließlichen Profilometrie kann kein *Staging* oder *Grading* erfolgen.

photodynamischen Diagnostik kann der Kontrast zwischen Neoplasien und gesundem Epithel verbessert werden, indem eine Substanz verabreicht wird, die über einen Metabolismus bevorzugt in neoplastischen Zellen in ein Fluorophor gewandelt wird.

Bei der Vergrößerungsendoskopie kommen sogenannte Lupen- bzw. Miniendoskope zum Einsatz, die durch den Arbeitskanal eines Standardendoskopes geschoben werden können. Sie haben einen Durchmesser von (2 ± 1) mm und einen Arbeitsabstand von (3 ± 2) mm, was zu einer Auflösung⁸ von $1 \mu\text{m}$ führt⁹, die natürlich aufgrund des fehlenden Kontrasts nicht zur Darstellung der Zellmorphologie genutzt werden kann. Lupenendoskope werden als Übersichtsendoskop bei Katheteranwendungen in engen Hohlorganen, beispielsweise in der Neuro- und Thoraxchirurgie, oder aber bei der Pit-Pattern-Diagnose (Kudo u. a. 1996) im Verdauungstrakt eingesetzt. Bei der Pit-Pattern-Diagnose wird das Epithel mit einem Farbstoff benetzt, der sich in den Drüsen (*pits*) sammelt und bei entsprechender Vergrößerung so eine Beurteilung der Form der Drüsen erlaubt. Das beobachtete Muster (*pit pattern*) wird dann einem Neoplasietyp zugeordnet. So kann ein *Staging* indirekt durchgeführt werden, wobei die Unsicherheit höher liegen muß als bei dem histologischen Standard.

C.4 BARRETT-Ösophagus

Infolge einer chronischen Refluxösophagitis können sich im Ösophagusepithel gastrale oder intestinale Metaplasien ausbilden. Histologisch handelt es sich also um den Ersatz von differenziertem Plattenepithel durch Zylinderepithel. Diese Erscheinung wird als BARRETT-Ösophagus¹⁰ bezeichnet. Die Diagnose basiert auf einer Biopsie mit anschließender histologischer Untersuchung (Ott u. a. 2000).

Der andauernde Entzündungsreiz kann Genominstabilitäten und den Übergang zu spezialisiertem, metaplastischen, intestinalen Epithel mit einem 30-fach gesteigerten Adenokarzinomrisiko bewirken (Riede u. a. 1989b). Das BARRETT-Epithel wird durch seine villöse Struktur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Becherzellen identifiziert. Es kann fokal oder als zusammenhängendes Areal auftreten. Innerhalb der BARRETT-Metaplasie kann sich dann, meist fokal oder multifokal, eine niedrig oder hochgradig maligne Neoplasie entwickeln.

Sowohl die BARRETT-Metaplasie als auch die BARRETT-Neoplasie sind mittels der konventionellen Endoskopie schwer zu identifizieren. Ist der BARRETT-Ösophagus endoskopisch sichtbar, wird generell eine Vierquadrantenbiopsie in regelmäßigen Zeitabständen empfohlen (Ott u. a. 2000). Bei der Vierquadrantenbiopsie werden im verdächtigen Ösophagusabschnitt im Abstand¹¹ von 2 cm je vier Biopsien bei den Orien-

⁸Bei den Herstellern herrscht die Unsitte vor, nur Vergrößerungen ihrer Instrumente anzugeben, was angesichts einer fehlenden Referenz als sinnfrei gewertet werden muß.

⁹Abschätzung als $0,61\lambda/N.A.$ bei $\lambda = 600 \text{ nm}$

¹⁰Die Erkrankung wurde ursprünglich als mechanische Verlagerung der Kardiaschleimhaut vom Magen weg aufgrund einer Schrumpfung eines abgeheilten Ulcus fehlinterpretiert (Barrett 1950).

¹¹Abstand in Richtung der Speiseröhrenrichtung

tierungen 0° , 90° , 180° und 270° entnommen. Diese Entnahme und Auswertung von etwa 16 bis 24 Biopsien ist zeit- und kostenintensiv und belastend für den Patienten. Die Diskussion um die Biopsiehäufigkeit wird eindeutig von dem Kosten-Nutzen-Verhältnis bestimmt, zumal die Effizienz der Vierquadrantenbiopsie zum Auffinden fokaler Läsionen bezweifelt werden muß. Hier wäre die Unterstützung durch die endoluminale Mikroskopie äußerst hilfreich und wünschenswert.

Die Therapie bei vorliegendem BARRETT-Ösophagus besteht primär in der Reduktion des Säurerefluxes, was lebenslang medikamentös durch säurehemmende Protonenpumpeninhibitoren oder einmal chirurgisch durch die Fundoplicatio erfolgen kann. Experimentell werden aktuell auch Methoden der chirurgischen Endoskopie erprobt.

Literaturverzeichnis

- AFC Technologies 1998** AFC TECHNOLOGIES: Testbericht der Breitbandquelle BBS 1310 B-TS, Seriennummer 1310980928 / AFC Technologies, Inc. 110 Adrien Robert, Hull, Qc J8Y 3S2, Kanada, 1998. – Forschungsbericht
- Barrett 1950** BARRETT, Norman R.: Chronic peptic ulcer in the esophagus and oesophagitis. In: *Br. J. Surg.* 38 (1950), S. 175–182
- Bloom und Fawcett 1975** BLOOM, W. ; FAWCETT, D. W.: *A Textbook of Histology*. 10. Auflage. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1975
- Bludau 1998a** BLUDAU, Wolfgang: *Lichtwellenleiter in Sensorik und optischer Nachrichtentechnik*. S. 74–84. Berlin, Heidelberg : Springer, 1998 (VDI-Buch)
- Bludau 1998b** BLUDAU, Wolfgang: *Lichtwellenleiter in Sensorik und optischer Nachrichtentechnik*. S. 314–319. Berlin, Heidelberg : Springer, 1998 (VDI-Buch)
- Bludau 1998c** BLUDAU, Wolfgang: *Lichtwellenleiter in Sensorik und optischer Nachrichtentechnik*. S. 232–236. Berlin, Heidelberg : Springer, 1998 (VDI-Buch)
- Boddy und Morucci 2001** BODDY, Keith ; MORUCCI, Jean-Pierre: *Guide to Physical and Engineering Sciences in Medicine*. International Union for Physical and Engineering Sciences in Medicine, <http://www.iupesm.org/guidemedicalphysics.pdf>. August 2001
- Born u. a. 1993** BORN, Max ; WOLF, Emil ; BEHRENS, Gustav: *Principles of Optics*. 6. Auflage. Pergamon Press, 1993
- Bourquin u. a. 2000** BOURQUIN, S. ; MONTEROSSO, V. ; SEITZ, P. ; SALATHÉ, R. P.: Video rate optical low-coherence reflectometry based on a linear smart detector array. In: *Optics Letters* 25 (2000), S. 102–104
- Bronstein u. a. 1993** BRONSTEIN, Ilja N. ; SEMENDJAJEW, Konstantin A. ; MUSIOL, Gerhard ; MÜHLIG, Heiner: *Taschenbuch der Mathematik*. Erste Auflage. Verlag Harri Deutsch, 1993
- Cha u. a. 1999** CHA, S. ; LIN, P. ; ZHU, L. ; BOTVINICK, E. L. ; SUN, P. C. ; FAINMAN, Y.: 3D profilometry using a dynamically configurable confocal microscope. In: NURRE, Joseph H. (Hrsg.) ; CORNER, Brian R. (Hrsg.): *Three-Dimensional Image Capture and Applications II* Bd. 3640. 1999, S. 246–253

- Corle und Kino 1996** CORLE, Timothy R. ; KINO, Gordon S.: *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. London : Academic Press, 1996
- Deltronic Crystal Industries 2001** DELTRONIC CRYSTAL INDUSTRIES: Lithium Niobate, Nonlinear optical applications / Deltronic Crystal Industries, Inc. 60 Harding Avenue, Dover, NJ 07801, USA, 2001. – Forschungsbericht
- Dickensheets und Kino 1999a** DICKENSHEETS, David L. ; KINO, Gordon S.: *Miniature scanning confocal microscope*. Stanford University, Patent (USA) 6 007 208. 1999
- Dickensheets und Kino 1999b** DICKENSHEETS, David L. ; KINO, Gordon S.: *Miniature Scanning Confocal Microscope*. Stanford University, Patent (USA) 5 907 425. 1999
- Dickensheets und Kino 2000** DICKENSHEETS, David L. ; KINO, Gordon S.: *Miniature Scanning Confocal Microscope*. Stanford University, Patent (USA) 6 088 145. 2000
- Drexler u. a. 1999** DREXLER, W. ; MORGNER, U. ; KÄRTNER, F. X. ; PITRIS, C. ; BOPPART, S. A. ; LI, X. D. ; IPPEN, E. P. ; FUJIMOTO, J. G.: In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography. In: *Optics Letters* 24 (1999), Nr. 17
- Drezek u. a. 1999** DREZEK, R. ; DUNN, A. ; RICHARDS-KORTUM, R.: Light Scattering from Cells: Finite-Difference Time Domain Simulations and Goniometric Measurements. In: *Applied Optics* 38 (1999), Nr. 16, S. 3651–3661
- Dubois u. a. 1999** DUBOIS, A. ; VABRE, L. ; LEBEC, M. ; LÉVÊQUE, S. ; BOCCARRA, A.C.: Real-time optical coherence microscopy in biological tissues. In: *Biomedical Optics: New Concepts in Therapeutic Laser Applications, Novel Biomedical Optical Spectroscopy, Imaging, and Diagnostics, Advances in Optical Imaging, Photon Migration and Tissue Optics*. Washington DC, 1999
- Dunn u. a. 1997** DUNN, A. ; SMITHPETER, C. ; WELCH, A. J. ; RICHARDS-KORTUM, R.: Finite-Difference Time Domain Simulations of Light Scattering from Single Cells. In: *Journal of Biomedical Optics* 2 (1997), Nr. 3, S. 262–266
- Dütting u. a. 1998** DÜTTING, Kaspar ; SCHURR, Marc ; BUSS, Gerhard ; MÜLLER, Gerhard ; WAGNER, Bernd: *Vorrichtung zur endoskopischen Diagnose und Behandlung von Gewebe*. Richard Wolf GmbH, Patent (Deutschland) 196 46 236 C2. 1998
- George u. a. 2002** GEORGE, Markus ; KNITTEL, Joachim ; RAESTRUP, Heike ; SCHNIEDER, Ludger ; BUSS, Gerhard F.: *Noninvasive Unterscheidung zwischen Platten- und Zylinderepithel mittels optischer Reflektometrie*. Poster, 119. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. Mai 2002
- George und Meining 2003** GEORGE, Markus ; MEINING, Alexander: Cresyl Violet as a Fluorophore in Confocal Laser Scanning Microscopy for Future in-vivo Histochemistry. In: *Endoscopy* 35 (2003)

- George u. a. 2001** GEORGE, Markus ; RAESTRUP, Heike ; SCHNIEDER, Ludger ; BUESS, Gerhard F.: Optical Coherence Microscopy for Squamous and Columnar Epithelium Discrimination: Potential and Clinical Applicability. In: *Proceedings of CARS* Bd. 1230, 2001
- George u. a. 2003** GEORGE, Markus ; SCHNIEDER, Ludger ; BUESS, Gerhard F.: Confocal device and application strategies for endoluminal optical coherence microscopy. In: DREXLER, Wolfgang (Hrsg.): *Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques* Bd. 5140. München, 2003
- Gerthsen und Vogel 1993** GERTHSEN, Christian ; VOGEL, Helmut: *Physik*. 17. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1993. – ISBN 3-540-56638-4
- Goodman 1968** GOODMAN, Joseph W.: *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill Book Company, 1968
- Gu u. a. 1991** GU, Min ; SHEPPARD, C. J. R. ; GAN, X.: Image formation in a fiber-optical confocal scanning microscope. In: *Journal of the Optical Society of America A* 8 (1991), Nr. 11, S. 1755–1761
- Hale und Query 1973** HALE, G. M. ; QUERRY, M. R.: Optical constants of water in the 200 nm to 200 μm wavelength region. In: *Appl. Opt.* 12 (1973), S. 555–563
- Harris 1990** HARRIS, Martin R.: *Confokales Abtast-Endoskop*. Optiscan Pty Ltd., Patent (Europäisches Patentübereinkommen) EP 0 393 165 B1. 1990
- Harris 2000** HARRIS, Martin R.: *Kompaktes konfokales Endoskop sowie Endomikroskopverfahren und -vorrichtung*. Optiscan Pty Ltd., Patent (Deutschland) 199 40 421 A1. 2000
- Hecht 1999a** HECHT, Eugene: *Optik*. S. 309–312. München : Oldenbourg, 1999. – ISBN 3-486-25186-4
- Hecht 1999b** HECHT, Eugene: *Optik*. S. 102. München : Oldenbourg, 1999. – ISBN 3-486-25186-4
- Hecht 1999c** HECHT, Eugene: *Optik*. München : Oldenbourg, 1999. – ISBN 3-486-25186-4
- Hecht 1999d** HECHT, Eugene: *Optik*. S. 337–339. München : Oldenbourg, 1999. – ISBN 3-486-25186-4
- Hoeling 2003** HOELING, Barbara M.: *private Mitteilung*. 2003
- Hoeling u. a. 2000** HOELING, Barbara M. ; FERNANDEZ, Andrew D. ; HASKELL, Richard C. ; HUANG, Eric ; MYERS, Whittier R. ; PETERSEN, Daniel C. ; UNGERSMA, Sharon E. ; WANG, Ruye ; FRASER, Scott E.: An optical coherence microscope for 3-dimensional imaging in developmental biology. In: *Optics Express* 6 (2000), Nr. 7, S. 136–146

- Hoffmann-La Roche AG 1999** HOFFMANN-LA ROCHE AG (Hrsg.): *Roche Lexikon Medizin*. Vierte Auflage. München : Urban & Fischer, 1999
- Hofmann u. a. 1999** HOFMANN, Ulrich ; MÜHLMANN, S. ; WITT, M. ; DÖRSCHEL, Klaus ; SCHÜTZ, Rijk ; WAGNER, Bernd: *Proceedings of the SPIE*. Bd. 3878. S. 29–38, 1999
- Huang u. a. 1991** HUANG, H. D. ; SWANSON, E. A. ; LIN, C. P. ; SCHUMAN, J. S. ; SINSON, W. G. ; CHANG, W. ; LEE, M. R. ; FLOTTE, T. ; GREGORY, K. ; PULIAFITO, C. A. ; FUJIMOTO, J. G.: Optical Coherence Tomography. In: *Science* 254 (1991), S. 1178–1181
- Irvine und Pollack 1968** IRVINE, W. M. ; POLLACK, J. B.: Infrared optical properties of water and ice spheres. In: *Icarus* 8 (1968), S. 324–360
- Izatt 2001** IZATT, Joseph A.: *private Mitteilung*. 2001
- Izatt u. a. 1996** IZATT, Joseph A. ; KULKARNI, Manish D. ; WANG, Hsing-Wen ; KOBASHI, Kenji ; JR., Michael V. S.: Optical Coherence Tomography and Microscopy in Gastrointestinal Tissues. In: *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 2 (1996), Nr. 4, S. 1017–1028
- Jäckle u. a. 2000** JÄCKLE, S. ; GLADKOVA, N. ; FELDCHEIN, F. ; TERENTIEVA, A. ; BRAND, B. ; GELIKONOV, G. ; GELIKONOV, V. ; SERGEEV, A. ; FRITSCHER-RAVENS, A. ; FREUND, J. ; SEITZ, U. ; SCHRÖDER, S. ; SOEHENDRA, N.: In Vivo Endoscopic Optical Coherence Tomography of Esophagitis, Barrett's Esophagus, and Adenocarcinoma of the Esophagus. In: *Endoscopy* 32 (2000), Nr. 10, S. 750–755
- Jackson und Jones 1989** JACKSON, D. A. ; JONES, J. D. C. ; CULSHAW, B. (Hrsg.) ; DAKIN, J. (Hrsg.): *Interferometers*. Bd. 2. Norwood, MA : Artech House, 1989
- Kimura und Wilson 1991** KIMURA, S. ; WILSON, T.: Confocal scanning optical microscope using single mode fibre for signal detection. In: *Applied Optics* 30 (1991), S. 2143–2150
- Knittel u. a. 2001** KNITTEL, Joachim ; SCHNIEDER, Ludger ; BUSS, Gerhard ; MESSERSCHMIDT, B. ; POSSNER, T.: Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient-index-lens system. In: *Optics Communications* 188 (2001), Nr. 5–6, S. 267–273
- Kohl u. a. 1995** KOHL, M. ; ESSENPREIS, M. ; COPE, M.: The Influence of Glucose Concentration upon the Transport of Light in Tissue-Simulating Phantoms. In: *Phys. Med. Biol.* 40 (1995), S. 1267–1287
- König u. a. 2001** KÖNIG, Frank ; KNITTEL, Joachim ; STEPP, Herbert: TechSight: Diagnosing cancer in vivo. In: *Science* 291 (2001), S. 1401

- Kudo u. a. 1996** KUDO, S. ; TAMURA, S. ; NAKAJIMA, T. ; YAMANO, H. ; KUSAKA, H. ; WATANABE, H.: Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. In: *Gastrointestinal Endoscopy* 44 (1996), Nr. 8–14
- Lauterborn u. a. 1993** LAUTERBORN, Werner ; KURZ, Thomas ; WIESENFELDT, Martin: *Kohärente Optik*. Erste Auflage. Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1993. – ISBN 3-540-56769-0
- LeFevre 1980** LEFEVRE, Herve C.: *Fiber Optic Polarization Controller*. Patent (USA) 4 385 090. 1980
- Li u. a. 2000** LI, X. D. ; BOPPART, S. A. ; DAM, J. V. ; MASHIMO, H. ; MUTINGA, M. ; DREXLER, W. ; KLEIN, M. ; PITRIS, C. ; KRINSKY, M. L. ; BREZINSKY, M. E. ; FUJIMOTO, J. G.: Optical Coherence Tomography: Advanced Technology for the Endoscopic Imaging of Barrett's Esophagus. In: *Endoscopy* 32 (2000), Nr. 12, S. 921–930
- Masters und So 2001** MASTERS, Barry R. ; SO, Peter T.: Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo. In: *Optics Express* 8 (2001), Nr. 1
- Mati u. a. 1997** MATI, S. ; SHEAR, J. B. ; WILLIAMS, R. M. ; ZIPFEL, W. R. ; WEBB, W. W.: Measuring Serotonin Distribution in Live Cells with Three-Photon Excitation. In: *Science* 275 (1997), S. 530–532
- Meschede 1999** MESCHEDER, Dieter: *Optik, Licht und Laser*. S. 121–122. Stuttgart, Leipzig : Teubner, 1999
- Minsky 1961** MINSKY, M.: *Microscopy apparatus*. Patent (USA) 3 013 467. 1961
- Müller und Roggan 1995** MÜLLER, G. (Hrsg.) ; ROGGAN, A. (Hrsg.): *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*. Bd. PM25. Bellingham WA, USA : SPIE Press, 1995
- Nipkow 1884** NIPKOW, Paul: *Elektrisches Teleskop*. Patent (Deutschland) 30105. 1884
- Ott u. a. 2000** OTT, R. ; LERSCH, C. ; WERNER, M. ; CLASSEN, M.: Barrett-Ösophagus – Diagnose und Management. In: *Internist* 41 (2000), S. 802–816
- Pan u. a. 1997** PAN, Yingtian ; BIRNGRUBER, Reginald ; ENGELHARD, Ralf: Contrast limits of coherence-gated imaging in scattering media. In: *Applied Optics* 36 (1997), Nr. 13, S. 2979–2983
- Pawley 1995** PAWLEY, James B. (Hrsg.): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, 1995
- Piston u. a. 1994** PISTON, D. W. ; MASTER, B. R. ; WEBB, W. W.: Three-dimensional resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging in the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy. In: *Journal of Microscopy* 178 (1994), Nr. Pt1, S. 20–27

- Pope und Fry 1997** POPE, R. M. ; FRY, E. S.: Absorption spectrum (380–700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements. In: *Appl. Opt.* 36 (1997), S. 8710–8723
- Povazay u. a. 2002** POVAZAY, B. ; BIZHEVA, K. ; UNTERHUBER, A. ; HERMANN, B. ; SATTMANN, H. ; FERCHER, A. F. ; DREXLER, W. ; APOLONSKI, A. ; WADSWORTH, W. J. ; KNIGHT, J. C. ; RUSSELL, P. St. J. ; VETTERLEIN, M. ; SCHERZER, E.: Submicrometer axial resolution optical coherence tomography. In: *Optics Letters* 27 (2002), Nr. 20, S. 1800–1802
- Pschyrembel 1982a** PSCHYREMBEL, Willibald: *Klinisches Wörterbuch*. S. 108. Berlin : de Gruyter, 1982
- Pschyrembel 1982b** PSCHYREMBEL, Willibald: *Klinisches Wörterbuch*. S. 329. Berlin : de Gruyter, 1982
- Pschyrembel 1982c** PSCHYREMBEL, Willibald: *Klinisches Wörterbuch*. S. 273,521,745,809. Berlin : de Gruyter, 1982
- Pschyrembel 1982d** PSCHYREMBEL, Willibald: *Klinisches Wörterbuch*. S. 415. Berlin : de Gruyter, 1982
- Querry u. a. 1978** QUERRY, M. R. ; CARY, P. G. ; WARING, R. C.: Split-pulse laser method for measuring attenuation coefficients of transparent liquids: application to deionized filtered water in the visible region. In: *Appl. Opt.* 17 (1978), S. 3587–3592
- Quickenden und Irvin 1980** QUICKENDEN, T. I. ; IRVIN, J. A.: The ultraviolet absorption spectrum of liquid water. In: *J. Chem Phys.* 72 (1980), S. 4416–4428
- Riede u. a. 1989a** RIEDE, Ursus-Nikolaus ; SCHAEFER, Hans-Eckart ; KREKELER, G. R. ; RIEDE, Ursus-Nikolaus (Hrsg.) ; SCHAEFER, Hans-Eckart (Hrsg.) ; WEHNER, Herbert (Hrsg.): *Digestorisches System*. Bd. 2. Stuttgart : Thieme, 1989. – 619 S
- Riede u. a. 1989b** RIEDE, Ursus-Nikolaus ; SCHAEFER, Hans-Eckart ; KREKELER, G. R. ; RIEDE, Ursus-Nikolaus (Hrsg.) ; SCHAEFER, Hans-Eckart (Hrsg.) ; WEHNER, Herbert (Hrsg.): *Digestorisches System*. Bd. 2. Stuttgart : Thieme, 1989. – 619 S
- Rogalla u. a. 2000** ROGALLA, P. ; BENDER, A. ; BICK, U. ; HUITEMA, A. ; VAN SCHELTINGA, J. T. ; HAMM, B.: Tissue transition projection (TTP) of the intestines. In: *European Radiology* 10 (2000), Nr. 5, S. 806–810
- Rollins u. a. 1998** ROLLINS, Andrew M. ; YAZDANFAR, Siavash ; KULKARNI, Manish D. ; UNG-ARUNYAWEE, Rujchai ; IZATT, Joseph A.: In vivo video rate optical coherence tomography. In: *Optics Express* 3 (1998), Nr. 6
- Sabharwal u. a. 1999** SABHARWAL, Y. S. ; ROUSE, A. R. ; DONALDSON, L. ; HOPKINS, M. F. ; GMITRO, Arthur F.: Slit-scanning confocal microendoscope for high-resolution in vivo imaging. In: *Applied Optics* 38 (1999), Nr. 34, S. 7133

- Schmitt und Knüttel 1997** SCHMITT, J. M. ; KNÜTTEL, A.: Model of optical coherence tomography of heterogeneous tissue. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 14 (1997), Nr. 6, S. 1231–1242
- Schnieder u. a. 2001** SCHNIEDER, Ludger ; RAESTRUP, Heike ; KRÖBER, S.M. ; SCHURR, Marc O. ; BUSS, Gerhard F.: Medizinische Untersuchungen zur Nutzung der Mikro-Scanningtechnologie für Diagnostik und Therapie in der endoskopischen Chirurgie. Projekt DELAS des Bundesministeriums für Bildung und Wissenschaft, Projektnummer 13N6943/1, 2001. – Forschungsbericht
- Segelstein 1981** SEGELSTEIN, D. J.: *The complex refractive index of water*. Master Thesis, University of Missouri-Kansas City. 1981
- Sheppard und Wilson 1978** SHEPPARD, C. J. R. ; WILSON, T.: Image formation in scanning microscopes with partially coherent source and detection. In: *Opt. Acta* 25 (1978), S. 315–365
- Snyder und Love 1983** SNYDER, A. W. ; LOVE, J. D.: *Optical Waveguide Theory*. London : Chapman and Hall, 1983
- Sorin und Baney 1992** SORIN, W. V. ; BANEY, D. M.: A Simple Intensity Noise Reduction Technique for Optical Low-Coherence Reflectometry. In: *IEEE Photonics Technology Letters* 4 (1992), Nr. 12, S. 1404–1406
- Statistisches Bundesamt 1999** STATISTISCHES BUNDESAMT (Hrsg.): *Todesursachen in Deutschland*. Wiesbaden : Statistisches Bundesamt der Bundesrepublik Deutschland, 1999 (Fachserie 12: Gesundheitswesen)
- Suga 2002** SUGA, Takeshi: *Confocal Optical System*. Olympus Optical Co., Patent (USA) 6 433 910 B2. 2002
- Tuchin 2000** TUCHIN, Valery: *Tutorial Texts in Optical Engineering*. Bd. TT38: *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. Bellingham WA, USA : SPIE Press, 2000
- Weber 1993** WEBER, Horst: *Bergmann · Schaefer, Lehrbuch der Experimentalphysik*. Bd. 3: *Nichtlineare Optik*. S. 913–926. Berlin, New York : de Gruyter, 1993
- Wilson und Jacques 1990** WILSON, Brian C. ; JACQUES, Steven L.: Optical Reflectance and Transmittance of Tissues: Principles and Applications. In: *IEEE Journal of Quantum Electronics* 26 (1990), Nr. 12, S. 2186–2199
- Wilson 1990** WILSON, Tony (Hrsg.): *Confocal Microscopy*. London : Academic Press, 1990
- Wilson und Sheppard 1990** WILSON, Tony (Hrsg.) ; SHEPPARD, C. J. R. (Hrsg.): *Theory and Practice of Scanning optical Microscopy*. London : Academic Press, 1990

Yariv 1997 YARIV, Amnon: *Optical electronics in modern communications*. Fünfte Auflage. New York : Oxford University Press, 1997 (The Oxford series in electrical and computer engineering)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Erich Plies danke ich für die engagierte Betreuung und die Begutachtung der Arbeit.

Auch Herrn Dr. rer. nat. habil. Ludger Schnieder gilt mein aufrichtiger Dank für die Übernahme des Korreferats.

Auf Seiten der Sektion für Minimal Invasive Chirurgie der Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Transplantation des Universitätsklinikums Tübingen danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern, die meine Arbeit inhaltlich, organisatorisch oder durch Aufrechterhalten der Infrastruktur unterstützt haben. Hierzu gehören auch die medizinisch ausgerichteten Mitarbeiter, die bei Tierversuchen am Schwein Gewebeproben entnahmen und die mit ihrem medizinischen oder medizintechnischen Wissen zur Verfügung standen.

Herrn Dr. rer. nat. habil. Ludger Schnieder, der in verschiedenen Funktionen in der Sektion koordinierend tätig war, danke ich für die Betreuung der Arbeiten zu Beginn, für wertvolle Anregungen bei der Beantragung von Fördermitteln und das Interesse, trotz seiner nicht unerheblichen Arbeitsbelastung stets über Probleme der Optik und Medizintechnik zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. med. Gerhard F. Bueß, dem Leiter der Sektion, danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und den damit verbundenen Freiraum, einen Arbeitsbereich, der sich primär mit der Evaluierung von optischen Diagnoseverfahren beschäftigte, zu einem Ort der aktiven Entwicklung biomedizinisch-optischer Systemtechnik auszubauen.

Die Grundlage für den Anfang dieser Entwicklung legten sicher die Kreativität und Initiative von Herrn Dr. rer. nat. Joachim Knittel, dem wohl primär die Einwerbung der Mittel für den Einstieg in die optische Kohärenzmikroskopie zuzuschreiben ist. In der Anfangsphase des Laboraufbaus war er ein hilfreicher Ansprechpartner und ermöglichte einen raschen Einstieg in die Problematik der endoluminalen Mikroskopie.

Ein überaus wertvoller Gesprächspartner war Dr. rer. nat. Joachim Groß, der stets mit Freude über physikalische und meßtechnische Fragestellungen diskutierte und seinen Erfahrungsschatz bereitwillig teilte.

Nicht zuletzt sei Herrn Hans-Jörg Saile unserer Entwicklungswerkstatt für die Anfertigung zahlreicher mechanischer Bauteile gedankt.

Während der Vakanz nach seinem Ausscheiden und bei toleranzkritischen Aufgaben haben mich die Mitarbeiter der feinmechanischen Werkstatt des Instituts für angewandte Physik stets freundlich und zügig unterstützt. Besonders hervorgehoben seien hier Herr Oskar Braun und Herr Falk Steinhilber, die die CNC-Fertigung des Gehäuses der konfokalen Sonde übernommen haben.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Elektronen- und Teilchenoptik des Instituts für Angewandte Physik danke ich für die herzliche Aufnahme. Herrn Dipl.-Ing. Werner Strohmaier gilt mein aufrichtiger Dank für den akkuraten Bau der zweikanaligen Schaltung zur Hochfrequenz-Demodulation.

Den Mitarbeitern der Elektronikwerkstatt des Instituts für Angewandte Physik danke ich für die Bereitstellung von Meßgeräten und deren engagierte Hilfsbereitschaft.

Herr Dipl.-Phys. Ralf Gärtner vom Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart hat mir die Möglichkeit gegeben, mit Hilfe der dortigen Ausstattung das Spektrum der Lichtquelle zu vermessen.

Der Landesstiftung Baden-Württemberg, dem Bundesministerium für Bildung und Wissenschaft, der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen und der Europäischen Union danke ich für die direkte oder indirekte finanzielle Förderung von Teilen dieser Arbeit, vor allem aber den steuerzahlenden Menschen, die hinter den genannten Institutionen stehen, in der Hoffnung, daß die Ergebnisse positiv auf die Gesundheitsversorgung der Zukunft wirken werden.

Schießlich danke ich all jenen, die einen vielleicht nur kleinen oder indirekten, aber sicherlich geschätzten Beitrag geleistet haben, beispielsweise dadurch, daß sie mir wie Frau Wen Jiang, MD, PhD ihre Versuchsratten unmittelbar nach deren Exitus überließen, Teile dieser Arbeit korrekturgelesen haben oder einfach nur ein ermunterndes Wort zur rechten Zeit bereit hatten.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums.