

J. Bille
W. Schlegel
(Hrsg.)

Medizinische Physik

3

Medizinische
Laserphysik

 Springer

J. Bille W. Schlegel (Hrsg.)

Medizinische Physik 3

Medizinische Laserphysik

Mit 272 Abbildungen und 40 Tabellen

Professor Dr. Josef Bille

Universität Heidelberg, Fakultät Physik und Astronomie
Kirchhoff-Institut Physik, Im Neuenheimer Feld 227
69120 Heidelberg, Deutschland

Professor Dr. Wolfgang Schlegel

Abt. Medizinische Physik, FSE, Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, Deutschland

ISBN 3-540-65255-8 Springer Berlin Heidelberg New York

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funk-sendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zu widerhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Springer ist ein Unternehmen von Springer Science+Business Media

springer.de

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005
Printed in Germany

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Satz: Frank Herweg, Leutershausen

Einbandabbildung von Frau Dipl. Phys. Renate Jerecic

Einbandherstellung: *design & production* GmbH, Heidelberg

SPIN: 10677736 57/3141/ba - 5 4 3 2 1 0 - Gedruckt auf säurefreiem Papier

Vorwort

Das vorliegende Buch ist der dritte Band einer dreibändigen Lehrbuchreihe zur Medizinischen Physik. Die Buchreihe ist auf der Grundlage der schriftlichen Kursunterlagen des Weiterbildungsstudiums „Medizinische Physik“ an der Universität Heidelberg entstanden. Es handelt sich um das erste umfassende deutschsprachige Lehrbuch der Medizinischen Physik.

Der Inhalt der drei Bände orientiert sich am Stoffkatalog der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Physik (DGMP). Er erfüllt damit, in Verbindung mit einem entsprechenden Leistungsnachweis und einer dreijährigen Berufserfahrung, eine der Voraussetzungen für die Weiterbildung, die von der DGMP zur Erlangung der Fachanerkennung für Medizinische Physik gestellt werden. Der Anerkennungsantrag muß jedoch individuell bei der DGMP gestellt werden.

Die drei Bände *Medizinische Physik* gelten in Zukunft als Arbeitsgrundlage für die in Blockform angebotenen Weiterbildungskurse an der Universität Heidelberg. Sie gliedern sich in Band 1: *Medizinische Physik: Grundlagen*, Band 2: *Medizinische Physik: Medizinische Strahlenphysik* und Band 3: *Medizinische Physik: Medizinische Laserphysik*. Die Spezialisierung auf den Gebieten der medizinischen Strahlenphysik und der medizinischen Laserphysik begründet sich durch die Forschungsschwerpunkte innerhalb der Medizinischen Physik an der Universität Heidelberg. Darüber hinaus entspricht der Inhalt der Bände 2 und 3 den Anforderungen an die Zertifizierung der Spezialrichtungen „Medizinische Strahlenphysik“ und „Medizinische Laserphysik“ der DGMP.

Im bereits erschienenen Band 1: *Medizinische Physik: Grundlagen* (1999) sind die Grundlagen aus der Medizin, die für die medizinische Physik und insbesondere für die Spezialisierungen „Medizinische Strahlenphysik“ und „Medizinische Laserphysik“ von Bedeutung sind, in Darstellungen zusammengefasst, die auf die Vorkenntnisse von Physikern abgestimmt sind. Bei den Grundlagen aus der Medizin handelt es sich im einzelnen um Anatomie, radiologische Anatomie, Physiologie und Pathologie. Als Grundlagen aus den Naturwissenschaften und der Mathematik werden Biochemie, molekulare Biophysik, Biophysik, Umweltphysik, Genetik, Biomathematik und medizinische Informatik behandelt. Aus dem Gebiet der Medizintechnik werden die Teilgebiete Biomagnetismus sowie medizinische Akustik und Audiologie

dargestellt. Des weiteren wird auf organisatorische, rechtliche und ethische Grundsätze im Gesundheitswesen eingegangen.

Im ebenfalls bereits erschienenen Band 2: *Medizinische Physik: Medizinische Strahlenphysik* (2002) ist das Gebiet der medizinischen Strahlenphysik in Grundlagen, Methoden und klinischen Anwendungen dargestellt. Im ersten Teil von Band 2 werden die Grundlagen der Kernphysik, die Wechselwirkung von Strahlung mit Materie, die Konzepte in der Strahlenphysik und Dosimetrie, die Messmethoden in der Dosimetrie, die Grundlagen der Strahleneffekte und Erzeugung von ionisierenden Strahlen zusammengefasst. Der zweite Teil von Band 2 bietet eine Darstellung der mathematischen, physikalischen und technischen Grundlagen der radiologischen Diagnostik. Dabei werden die Nuklearmedizin, die Ultraschalldiagnostik, die Röntgencomputertomographie und die Magnetresonanztomographie sowie -spektroskopie behandelt. Im dritten Teil von Band 2 wird auf die mathematischen, physikalischen und technischen Grundlagen der Strahlentherapie eingegangen. Es werden die Bestrahlungsgeräte der Teletherapie und die Therapieplanung beschrieben. Der vierte Teil von Band 2 bietet eine Auswahl von Themen aus der klinischen Radiologie.

Der vorliegende Band 3, *Medizinische Laserphysik*, gliedert sich in

- physikalische Grundlagen: visuelles System (Kap. 1), optische Komponenten (Kap. 2), Beugungsoptik (Kap. 3), kohärente Optik (Kap. 4), nichtlineare Optik und kurze Laserpulse (Kap. 5), lineare Laserspektroskopiemethoden (Kap. 6), nichtlineare Laserspektroskopiemethoden (Kap. 7),
- medizinisch-optische diagnostische Systeme: konfokale Mikroskopie in der Genomforschung (Kap. 8), hochauflösende 3D-Lichtmikroskopie (Kap. 9), Flusszytometrie (Kap. 10),
- moderne Verfahren der Interferometrie und Lasermesstechnik: optische Datenerfassung und Verarbeitung (Kap. 11), Holographie (Kap. 12), optische Interferometrie (Kap. 13),
- medizinische Lasersysteme und Laserchirurgie: Lasersysteme (Kap. 14), Laser-Gewebe-Wechselwirkungen (Kap. 15), Laser in der Augenheilkunde (Kap. 16), Laseranwendungen in der Orthopädie (Kap. 17), stereotaktische Laserneurochirurgie (Kap. 18), Anwendungen der Lasertechnik in der Zahnarztpraxis (Kap. 19), Lasersicherheit Gerätetechnik: Medizinproduktegesetz und technische Normen (Kap. 20).

Damit wird den Medizinphysikern wie auch den Lasermedizinern eine umfassende Darstellung geboten, die auf der Grundlage der physikalischen Prinzipien und der gerätetechnischen Verfahren zu einem vertieften Verständnis der vielfältigen diagnostischen und therapeutischen Einsatzmöglichkeiten der medizinischen Laserphysik in der biomedizinischen Forschung wie auch der klinischen Praxis führt.

An der Überarbeitung der Manuskripte haben die Mitglieder des Heidelberger Graduiertenkollegs Tumordiagnostik und -therapie unter Einsatz dreidimensionaler radiologischer und lasermedizinischer Verfahren mitgewirkt.

Danken möchten wir insbesondere den Tutoren der Beiträge des vorliegenden Buchs, Frau Dipl. Phys. Joana Büchler de Matos Costa, Herrn Dr. Klaus Greger, Herrn Dr. Lars Georg Hildenbrand, Herrn Dr. Thomas Hübner, Herrn Dr. Michael Klingenberg, Frau Dr. Nicole Marme, Herrn Dr. Thomas Nirmaier, Herrn Dr. Markus Rheinwald, Herrn Dr. Steffen Sammet, Herrn Dr. Andreas Velten, Herrn Olivier La Schiazza sowie Herrn Dr. Oliver Vossen.

Bei der Überarbeitung, der Zusammenführung und Abstimmung der Manuskripte haben sich Herr Dr. Klaus Borkenstein, Frau Dr. Nina Korablinova und Herr Dr. Christian Rumpf verdient gemacht. Ihnen gilt unser ganz besonderer Dank.

Heidelberg,
März 2004

*Josef Bille
Wolfgang Schlegel*

Inhaltsverzeichnis

1 Das visuelle System des Menschen

J.F. Bille, N.A. Korablinova, U. von Pape, A. Schmitt-Lieb	1
1.1 Die Optik des Auges	1
1.1.1 Physiologie des menschlichen Auges	1
1.1.2 Das optische System des Auges	2
1.1.3 Modelle des menschlichen Auges	3
1.2 Grenzen der räumlichen Auflösung des Auges	5
1.2.1 Auflösungsvermögen (Visus)	5
1.2.2 Einfluss der Beugungseffekten	6
1.2.3 Abbildungsfehler des menschlichen Auges	9
1.2.4 Rezeptorendichte der Netzhaut	10
1.3 Optische Qualität des Auges	12
1.4 Hornhauttopographie	15
1.4.1 Messmethoden	15
1.4.2 Darstellung der Hornhauttopographie	21
1.4.3 Ausblick	21
1.5 Aberrometrie	22
1.5.1 Messmethoden	22
1.5.2 Darstellung der Ergebnisse	25
1.6 Wellenfrontbasierte Optimierung der optischen Abbildung des menschlichen Auges mittels refraktiver Laserchirurgie	28
1.6.1 Einführung	28
1.6.2 Die wellenfrontgesteuerte LASIK	31
1.6.3 Erste klinische Ergebnisse der wellenfrontgesteuerten LASIK verglichen mit Daten der konventionellen LASIK-Methode	33
1.6.4 Ausblick	37
Literatur	38

2 Optische Komponenten

M. Niemz	39
2.1 Eigenschaften von optischen Substraten	39
2.2 Brechende Medien	41
2.2.1 Linsen	41

X	Inhaltsverzeichnis	
2.2.2	Prismen	42
2.2.3	Lichtfasern	42
2.3	Beschichtungen, Spiegel und Filter	44
2.3.1	Metallische Beschichtungen	44
2.3.2	Dielektrische Beschichtungen	45
2.4	Polarisationsempfindliche Optiken	46
2.4.1	Polarisatoren	46
2.4.2	Verzögerungsplatten	47
2.4.3	Pockel-Zellen	47
2.4.4	Faraday-Rotatoren	48
2.5	Lichtmodulatoren	48
2.6	Optische Detektoren	49
2.6.1	Photodioden	49
2.6.2	Charge-Coupled Devices (CCD)	49
2.6.3	Photomultiplier	50
2.6.4	Streak-Kameras	50
Literatur	51
3 Beugungsoptik		
R. Müller, T. Fernholz	53
3.1	Einführung und einfache Beispiele	53
3.1.1	Was ist Beugung?	53
3.1.2	Beispiele für Beugung	53
3.1.3	Das Huygens-Fresnel-Prinzip	53
3.1.4	Die Beugung am Doppelspalt	54
3.1.5	Die Beugung am Einzelspalt	55
3.1.6	Die Beugung am Gitter	56
3.1.7	Der Einfluss der endlichen Spaltbreite	57
3.2	Die Theorie der Beugung	57
3.2.1	Das Beugungsintegral	58
3.2.2	Das Babinet-Prinzip	59
3.3	Die Fraunhofer-Beugung	60
3.3.1	Die Berechnung einer rechteckigen Blende	61
3.3.2	Die Beugung an einer kreisförmigen Blende	62
3.3.3	Das Auflösungsvermögen eines optischen Instruments	66
3.4	Fresnel-Beugung	66
3.4.1	Die Cornu-Spirale	69
Literatur	71
4 Kohärente Optik		
R. Grimm	73
4.1	Der Kohärenzbegriff	73
4.1.1	Interferenzfähigkeit des Lichts	73
4.1.2	Zeitliche Kohärenz	75

4.1.3	Räumliche Kohärenz	77
4.2	Ausbreitung von Laserlicht: der Gauß-Strahl	78
4.3	Resonante Wechselwirkung von Laserlicht und Materie	82
4.3.1	Elektromagnetische Welle im polarisierbaren Medium	82
4.3.2	Klassisches Oszillatormodell: Absorption und Dispersion	84
4.3.3	Verbindung zur Quantenmechanik und Lasertheorie	85
Literatur		87
5 Nichtlineare Optik und kurze Laserpulse		
F.X. Kärtner		89
5.1	Ausbreitung elektromagnetischer Wellen	89
5.2	Lineare Wellenausbreitung	90
5.2.1	Dispersion	90
5.2.2	Dämpfung und Verstärkung	93
5.3	Nichtlineare Wellenausbreitung	93
5.3.1	Die nichtlineare Suszeptibilität	94
5.3.2	Wichtige nichtlineare Prozesse	96
5.4	Erzeugung von kurzen Laserpulsen	99
5.5	Güteschaltung	101
5.5.1	Aktive Güteschaltung	101
5.5.2	Passive Güteschaltung	102
5.6	Modenkopplung	103
5.6.1	Aktive Modenkopplung	103
5.6.2	Passive Modenkopplung	105
5.7	Lasersysteme	107
5.7.1	Kompakter diodengepumpter modengekoppelter Laser	107
5.7.2	Regenerativer Verstärker	108
Literatur		108
6 Lineare Laserspektroskopiemethoden		
T. Dreier		111
6.1	Lineare Laserspektroskopiemethoden	111
6.1.1	Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)	111
6.1.2	Zweiniveaumodell der LIF	113
6.2	Absorptionsspektroskopie	116
6.2.1	Absorption und Dispersion	116
6.2.2	Absorptionsspektroskopie mit Lasern	118
Literatur		125
7 Nichtlineare Laserspektroskopiemethoden		
T. Dreier		127
7.1	Die nichtlineare Wechselwirkung von quantenmechanischen Systemen mit Licht	127
7.1.1	Nichtlineare Raman-Prozesse	127

XII Inhaltsverzeichnis

7.2	Nichtlineare Absorptionsspektroskopie	132
7.2.1	DFWM	133
7.2.2	Lasermassenspektroskopie	135
Literatur		136
8	Konfokale Mikroskopie in der Genomforschung	
C. Cremer		137
8.1	Problemstellung	137
8.2	Methodische Grundlagen der dreidimensionalen Mikroskopie	139
8.2.1	Grundprinzip	139
8.2.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	140
8.2.3	Fluoreszenzmarkierungstechniken für die 3D-Mikroskopie des Genoms	144
8.2.4	Dreidimensionale Digitale Bildverarbeitung	145
8.2.5	Experimentelle Kalibrierungsmessungen	148
8.2.6	Modelle zur Architektur von Zellkern und Chromosomen	155
8.3	Ergebnisse	158
8.3.1	Ausdehnung individueller Chromosomenterritorien im Zellkern: Vergleich mit quantitativen Voraussagen	158
8.3.2	Exklusivität der Chromosomenterritorien	159
8.3.3	Morphologie von Chromosomenterritorien	159
8.3.4	Topologie der Chromosomenterritorien	162
8.3.5	Dynamik der Kernarchitektur	164
8.4	Perspektiven	165
8.4.1	Bedeutung einer dreidimensionalen Kernarchitektur	165
8.4.2	Weiterentwicklung der konfokalen Mikroskopie	166
8.4.3	Verbesserung von Markierungsmethoden	169
8.4.4	Weiterentwicklung von Computermodellen	169
Literatur		171
9	Hochauflösende 3D-Lichtmikroskopie	
S.W. Hell		179
9.1	Grundlegendes zur Auflösung	179
9.2	Die Punktabbildungsfunktion als dreidimensionale Sonde	182
9.2.1	Das konfokale Fluoreszenzrastermikroskop	182
9.2.2	Das Multiphotonenfluoreszenzrastermikroskop	187
9.2.3	Anregung durch Ein- und Multiphotonenabsorption	189
9.2.4	Limitierende Effekte in der Multiphotonenmikroskopie ..	196
9.2.5	Die Detektionseffizienz eines Rastermikroskops	198
9.2.6	Anwendungsbeispiele der Multiphotonenmikroskopie	198
9.2.7	Auflösung der Ein- und Multiphotonenmikroskopie	202
9.2.8	Konfokale Multiphotonenmikroskopie	202
9.3	Point-Spread-Function-Engineering als Ansatz zur Auflösungserhöhung im Fernfeldmikroskop	203

9.3.1	Grundlagen der 4π -konfokalen Mikroskopie	204
9.3.2	Multiphotonen- 4π -konfokale Mikroskopie	208
9.3.3	Höchstauflösung in lateraler Richtung: Neuere Konzepte .	212
9.4	Zusammenfassung und Ausblick	213
	Literatur	214
10 Flusszytometrie		
M.	Hausmann	215
10.1	Historie	216
10.2	Allgemeiner Aufbau und Prinzip eines Flusszytometers	217
10.3	Technische Aspekte	220
10.3.1	Lichtquellen	220
10.3.2	Anregungsoptik	220
10.3.3	Detektionsoptik	223
10.3.4	Hydrodynamik von „Jet-in-Air“-Tröpfchensortern	225
10.4	Fluoreszenzmarkierung	230
10.5	Slit-Scan-Analyse und Sortierung	231
	Literatur	234
11 Optische Datenerfassung und -verarbeitung		
H.	Tiziani	237
11.1	Optische Datenspeicherung und -wiedergabe bei CD	237
11.1.1	Konfokale Mikroskopie	239
11.1.2	Bildübertragung	241
11.1.3	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	243
11.1.4	Beobachtung	244
	Literatur	248
12 Holographie und holographische Interferometrie		
H.	Tiziani	249
12.1	Aufzeichnung, Speicherung und Rekonstruktion des Hologramms	249
12.1.1	Aufzeichnung des Hologramms	249
12.1.2	Rekonstruktion des Hologramms	250
12.1.3	Holographische Interferometrie	251
	Literatur	255
13 Optische Interferometrie		
H.	Tiziani	257
13.1	Grundbegriffe der Interferometrie	257
13.1.1	Linienbreite der Lichtquelle und Kohärenzlänge	257
13.1.2	Räumliche Kohärenz	259
13.1.3	Zweistrahlinterferenz	259
13.1.4	Zweistrahlinterferenzanordnungen	260

XIV Inhaltsverzeichnis

13.2	Einige Interferenzanordnungen in der Messtechnik	261
13.2.1	Fizeau-Interferenzgerät	261
13.2.2	Michelson-Anordnung	262
13.2.3	Twyman-Green-Interferometer	263
13.2.4	Interferometrie in der Längenmessung	264
13.2.5	Mach-Zehnder-Interferometer	264
13.2.6	Wellenfrontscherungsinterferometer	265
13.3	Digitale interferometrische Messtechnik	266
13.3.1	Phasenschiebeverfahren	267
13.3.2	Anwendung der Interferenzmethoden in der Mikroskopie	269
13.4	Heterodynverfahren	271
13.5	Interferometrische Längenmessung	272
13.5.1	Interferometrische Messung geometrischer Größen und Fehlerquellen	274
13.5.2	Fehlerquellen	275
13.6	Weitere Verfahren der interferometrischen Messtechnik	275
13.6.1	Zweiwellenlängen-(2λ)-Verfahren	275
13.6.2	Interferometer mit computergeneriertem Prüfhologramm	276
13.6.3	Weißlichtinterferometrie	276
Literatur		277

14 Lasersysteme

J. Bille		279
14.1	Gaslaser	279
14.1.1	Helium-Neon-(HeNe)-Laser	279
14.1.2	Argon-Ionen-(Ar ⁺)-Laser	281
14.1.3	Kohlendioxid-(CO ₂)-Laser	282
14.1.4	Excimerlaser	286
14.1.5	Konstruktion	288
14.1.6	Farbstofflaser	290
14.1.7	Laseraufbau	293
14.2	Festkörperlaser	295
14.2.1	Rubinlaser	296
14.2.2	Neodym-YAG-Laser (inkl. Erbium-, Holmiumlaser)	297
14.2.3	Halbleiterlaser	300
14.3	Diodengepumpte Festkörperlaser	303
14.4	Ultrakurzpulslaser	305
14.4.1	Pikosekundenlaser im IR, sichtbaren und UV-Spektralbereich	305
14.4.2	Ti:Saphir-Femtosekundenlaser	314
14.5	Freie-Elektronen-Laser	319
14.5.1	Physikalisches Prinzip der Freie-Elektronen-Laser	319

14.5.2	Die Freie-Elektronen-Laser FELIX und S-DALINAC	320
14.5.3	Medizinische Forschung mit FEL	321
Literatur		322
15	Laser-Gewebe-Wechselwirkungen	
J. Bille		323
15.1	Überblick über die Arten der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen	323
15.1.1	Klassifizierung nach Wechselwirkungszeiten	323
15.1.2	Beispiele für die klinische Lasertherapien	324
15.2	Photochemische Wechselwirkung	325
15.2.1	Grundlagen der photochemischen Wechselwirkung	325
15.2.2	Prinzip der photodynamischen Therapie	326
15.3	Photothermische Wechselwirkung	326
15.3.1	Grundlagen der photothermischen Wechselwirkung	326
15.3.2	Modell der photothermischen Wechselwirkung	328
15.4	Photoablative Wechselwirkung	331
15.4.1	Grundlagen der photoablativen Wechselwirkung	331
15.4.2	Modell der photoablativen Wechselwirkung	333
15.5	Photodisruptive/plasmainduzierte Wechselwirkung	335
15.5.1	Grundlagen der photodisruptiven/ plasmainduzierten Wechselwirkung	335
15.5.2	Theoretisches Modell der plasmainduzierten Ablation	339
15.5.3	Dynamik des Ablationsprozesse	341
Literatur		343
16	Laser in der Augenheilkunde	
J.F. Bille, M.H. Niemz		345
16.1	Diagnostische Laseranwendungen	347
16.1.1	Laserscanningtomographie zur Glaukomdiagnostik („grüner Star“)	348
16.1.2	Aktiv-optische Verbesserung der Tiefenauflösung	349
16.1.3	Fourier-ellipsometrische Vermessung der Nervenfaserschicht	350
16.2	Therapeutische Laseranwendungen	352
16.2.1	Die Netzhaut	352
16.2.2	Die Linse	353
16.2.3	Die Iris	355
16.2.4	Das Trabekelwerk	356
16.2.5	Die Sklera	356
16.2.6	Die Hornhaut	357
16.3	Ausblick	361
Literatur		362

17 Laseranwendung in der Orthopädie	
C. Rumpf	365
17.1 Einführung	365
17.2 Minimal-invasive Behandlung von Deformierungen der Wirbelsäule durch Laserablation	365
17.2.1 Physikalische Eigenschaften von Knochengewebe	366
17.2.2 Minimal-invasive Skoliosebehandlung mit dem Ho:YAG-Laser	368
17.3 LITT von Knochentumoren unter MRT-Temperaturkontrolle	375
17.3.1 Experimenteller Aufbau	377
17.3.2 Histologische Untersuchungen	379
17.3.3 Knochenkoagulation mit dem Nd:YAG-Laser	380
17.3.4 Knochenkoagulation mit dem Diodenlaser	381
17.3.5 Online-MRI-Temperaturkontrolle während Laserkoagulation von Knochengewebe	383
Literatur	387
18 Stereotaktische Laserneurochirurgie	
K. Greger, J. Bille, W. Schlegel, V. Sturm	391
18.1 Stereotaktische Bestrahlungstechniken	394
18.1.1 Stereotaxie	395
18.2 Laserneurochirurgie	396
18.2.1 Laserlichtquellen	396
18.2.2 Laserablation von Hirngewebe	398
18.2.3 Stereotaktische Lasersonde	400
18.2.4 Eine zukünftige Strategie	401
18.3 Diagnosesysteme	403
18.3.1 Fluoreszenzmikroskopie	403
18.3.2 Autofluoreszenz	404
18.3.3 OCSA	406
18.3.4 Adaptive Optik	407
Literatur	410
19 Anwendungen der Lasertechnik in der Zahnarztpraxis	
T. Pioch	413
19.1 Softlaser und Hardlaser	413
19.1.1 Softlaser	413
19.1.2 Hardlaser	413
19.2 Anwendungsobjekt Zahn	414
19.3 Wechselwirkungen mit Zahnhartsubstanzen	416
19.3.1 Photothermische-, thermomechanische Wirkung	416
19.3.2 Photochemische Wirkung	417
19.3.3 Photoablativ Wirkung	417
19.3.4 Photodisruptive Wirkung	418

19.4	In Erprobung befindliche Lasersysteme für die Bearbeitung von Zahnhartsubstanzen	418
19.5	Laseranwendungen in verschiedenen Bereichen der Zahnheilkunde	423
19.5.1	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie	423
19.5.2	Parodontologie	424
19.5.3	Zahnüberempfindlichkeiten	425
19.5.4	Endodontologie	425
19.5.5	Füllungen	427
19.5.6	Kariesprophylaxe	427
19.5.7	„Laserbiostimulation“ und Lokalanästhesie	428
19.5.8	Laserschweißen	428
19.5.9	Diagnostik	429
19.6	Ausblick	429
	Literatur	431

20 Lasersicherheit Gerätetechnik: Medizinproduktegesetz und Technische Normen

M. Götz	435	
20.1	Einleitung	435
20.2	Medizinproduktegesetz	435
20.2.1	Zertifizierung – Akkreditierung – Prüfung (Benannte Stellen)	436
20.2.2	Grundlegende Anforderungen	436
20.2.3	Risikoklassen	437
20.2.4	Konformitätsbewertungsverfahren	438
20.2.5	Betreiberverordnung über aktive Medizinprodukte	439
20.2.6	Für die klinische Prüfung bestimmte Produkte	440
20.3	Technische Normen für medizinische Laser	440
20.3.1	Bezeichnungen	442
20.3.2	Die zehn Grundgedanken der Normung	443
20.3.3	Die Norm DIN EN 60825-1	443
20.3.4	Die Vornorm DIN V 18734 (Medizinisch-Therapeutische Lasergeräte)	444
	Literatur	445
	Sachverzeichnis	447

Mitarbeiter

Dr. J. Bähr

Universität Mannheim
Lehrstuhl für Optoelektronik
B 6, 26 Rhenania-Gebäude 3.18
68131 Mannheim

Prof. Dr. J.F. Bille

Kirchhoff-Institut für Physik
Im Neuenheimer Feld 227
69120 Heidelberg

Prof. Dr. C. Cremer

Kirchhoff-Institut für Physik
Im Neuenheimer Feld 227
69120 Heidelberg

Dr. T. Dreier

Paul Scherrer Institut
Abt. ENE-OVGA
CH-5232 Villingen PSI, Schweiz

Dr. T. Fernholz

Physikalisches Institut
Philosophenweg 12
69120 Heidelberg

Dr. M. Götz

MRC Systems GmbH
Hans-Bunte-Straße 10
69123 Heidelberg

Dr. K. Greger

Kirchhoff-Institut für Physik
Im Neuenheimer Feld 227
69120 Heidelberg

Prof. Dr. R. Grimm

Universität Innsbruck
Institut für Experimentalphysik
Technikerstraße 25
A-6020 Innsbruck, Österreich

PD Dr. M. Hausmann

Pathologisches Institut
Albertstraße 19
79104 Freiburg

Prof. Dr. S. Hell

MPI Für Biophysikalische Chemie
Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut
Am Faßberg 11
37077 Göttingen

Prof. Dr. E.G. Jung

Hautklinik
Theodor-Kutzer-Ufer
68167 Mannheim

Prof. Dr. F.X. Kärtner

Massachusetts Institute
of Technology
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139-4307, USA

Dr. N.A. Korablinova

Kirchhoff-Institut für Physik
Im Neuenheimer Feld 227
69120 Heidelberg

Dr. R. Müller

Axaron Bioscience AG
Im Neuenheimer Feld 515
69120 Heidelberg

Prof. Dr. M. Niemz

MABEL
Theodor-Kutzer-Ufer 1–3
68167 Mannheim

Dr. U. von Pape

20/10 Perfect Vision
Optische Geräte GmbH
Am Taubenfeld 21/1
69123 Heidelberg

PD Dr. T. Pioch

Universitätsklinik für Mund-,
Zahn- und Kieferkrankheiten
Poliklinik für Zahnerhaltungskunde
Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg

Dr. C. Rumpf

GE Medical Systems
Newtonstraße 3
85221 Dachau

Prof. Dr. W. Schlegel

Deutsches Krebsforschungszentrum
Abt. Medizinische Physik
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

A. Schmitt-Lieb

Augen-Laser-Klinik GmbH
Partensteiner Str. 6
97816 Lohr am Main

Prof. Dr. med. V. Sturm

Klinik für Stereotaxie
und Funktionelle Neurochirurgie
Klinikum der Universität zu Köln
Kerpenerstraße 62
50924 Köln

Prof. Dr. H. Tiziani

Universität Stuttgart
Institut für Technische Optik
Pfaffenwaldring 9
70569 Stuttgart

1 Das visuelle System des Menschen

J.F. Bille, N.A. Korablinova, U. von Pape, A. Schmitt-Lieb

1.1 Die Optik des Auges

1.1.1 Physiologie des menschlichen Auges

Der dioptrische Apparat des menschlichen Auges besteht aus der durchsichtigen Hornhaut (Kornea), den mit Kammerwasser gefüllten vorderen und hinteren Augenkammern, der die Pupille bildenden Iris, der Linse, die von einer durchsichtigen Linsenkapsel umgeben ist, und dem Glaskörper, der den größten Raum des Augenpaares ausfüllt (Abb. 1.1).

Seine typische Kugelform erhält der Augapfel durch eine feste Bindegewebehülle, deren größter Teil durch die Lederhaut (Sklera) gebildet wird. Nach vorn wird diese von der stärker gewölbten, durchsichtigen Hornhaut unterbrochen. Die Vorderseite der Hornhaut wird ständig durch Tränenflüssigkeit benetzt, die wiederum von einem Lipidfilm bedeckt ist. Dies ist wichtig für die optische Qualität des Auges, da so die Oberfläche immer glatt ist und außerdem kleine Verunreinigungen sofort weggespült werden.

Die Iris dient als Aperturblende zur Regulierung der Lichtmenge, die durch die Pupille in das Auge eintritt. Direkt hinter der Iris befindet sich

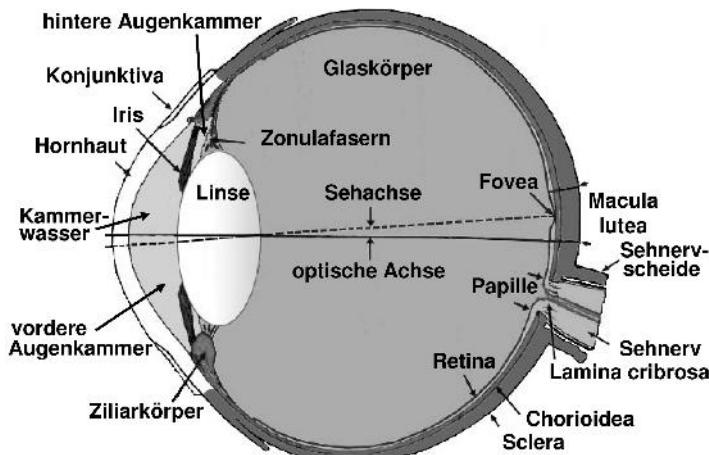


Abb. 1.1. Aufbau menschlichen des Auges [7]

die Linse. Sie ist an kleinen Ziliarkörpern fixiert, die ihr durch Kontraktion erlauben, kugelförmiger zu werden, und so ihre Brechkraft zu erhöhen. Durch diese Änderung der Linsenkrümmung (Akkommodation) kann das Auge hinsichtlich einer scharfen Abbildung auf verschiedene Entfernungen eingestellt werden und nicht nur Objekte aus der Ferne, sondern auch aus der Nähe abbilden.

Der Glaskörper ist ein wasserklares Gel aus extrazellulärer Flüssigkeit, in der Kollagen und Hyaluronsäure kolloidal gelöst sind.

Die hintere innere Oberfläche des Auges wird von der Retina (Netzhaut) ausgekleidet. Sie ist Träger der Lichtrezeptoren – Stäbchen und Zapfen – und übernimmt die eigentliche sensorische Aufgabe des Auges. Der Raum zwischen der Retina und Sklera wird durch das Gefäßnetz der Aderhaut oder *Chorioidea* ausgefüllt, auf der die Netzhaut liegt. Am hinteren Pol des Auges hat die menschliche Retina eine kleine Grube, die *Fovea centralis*. Sie ist für das Tageslichtsehen die Stelle des schärfsten Sehens und normalerweise der Schnittpunkt der optischen Achse des Auges mit der Netzhaut.

1.1.2 Das optische System des Auges

Das optische System des Auges wird durch Hornhaut, Kammerwasser, Linse und Glaskörper gebildet. Es entwirft auf der Netzhaut ein umgekehrtes und verkleinertes Bild. Hierzu müssen die Größe des Auges und seine gesamte Brechkraft genau aufeinander abgestimmt sein, damit ein Objekt auf der Netzhaut scharf abgebildet wird (Kap. 1.2.3) [1, 7].

Der Brechungsindexunterschied zwischen Luft und der Hornhautoberfläche ist am größten. Dies bewirkt, daß die Hornhaut den größten Anteil von etwa 43 dpt der Brechkraft des Auges trägt. Dabei entfallen ca. 49 dpt auf die Vorderseite der Hornhaut, die Brechkraft an der Hornhautrückseite vermindert diese Brechkraft um 6 dpt. Die Linse sitzt ungefähr 5 mm hinter der Hornhaut und besitzt im entspannten Auge eine Brechkraft von 19 dpt. Diese addiert sich zur Brechkraft der Hornhaut näherungsweise nach der Gullstrand-Formel¹ so, daß die Gesamtbrechkraft des menschlichen Auges insgesamt ca. 59 dpt beträgt.

¹ Die Gesamtbrechkraft B_{gesamt} von zwei brechenden Flächen kann nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$B_{\text{gesamt}} = B_1 + B_2 - B_1 B_2 \frac{d}{n}. \quad (1.1)$$

Dabei sind B_1 und B_2 die Einzelbrechkräfte der brechenden Flächen, d der Abstand der einander zugewandten Hauptebenen der einzelnen Systeme und n der Brechungsindex des zwischenliegenden Mediums.

1.1.3 Modelle des menschlichen Auges

Zur Beschreibung der Abbildungseigenschaften des menschlichen Auges werden verschiedene Modelle des dioptrischen Systems aufgestellt, die sowohl sphärische als auch asphärische Modelle beinhalten [5].

Ein Modell des menschlichen Auges ist das reduzierte Auge, das zur vereinfachten Beschreibung der achsennah abbildenden Lichtbündel verwendet werden kann (Abb. 1.2). Im reduzierten Auge ist die Dioptrik des Auges für den medizinischen Alltag stark vereinfacht: Die brechenden Elemente des Auges – Hornhaut und Linse – werden nur durch eine einzige brechende Fläche dargestellt, und der Knotenpunkt² liegt auf ihrem Krümmungsmittelpunkt. Der Abstand von dem Knotenpunkt bis zur Retina beträgt ca. 17 mm [2]. Damit liegt die Gesamtbrechkraft des reduzierten Auges bei ca. 59 dpt, wobei der Brechungsindex konstant über das Auge ($n = 1,336$) angenommen wird.

Ein weiteres Modell des menschlichen Auges stellt das schematische Auge dar. Dieses Modell weist schon zwei brechende Flächen auf: Die Hornhaut und Linse werden als zwei getrennte Brechungselemente im Auge dargestellt. Die optischen Konstanten des schematischen Auges entsprechen einem Durchschnittswert für erwachsene Europäer (Tabelle 1.1). Auf diese Werte werden die Berechnungen für Brillengläser abgestimmt.

Abbildung 1.3 zeigt einen Vergleich der dioptrischen Daten des reduzierten und schematischen Auges.

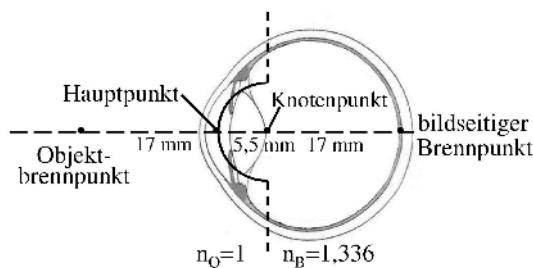
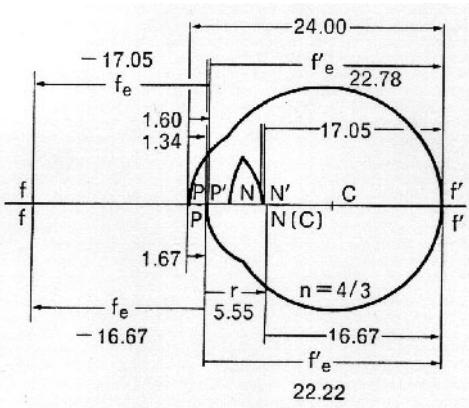


Abb. 1.2. Das reduzierte Auge gibt auf einfache Weise die optischen Eigenschaften des Systems Bild–Linse–Projektion wieder

² Der Knotenpunkt ist der Punkt auf der optischen Achse, für den gilt, daß Lichtstrahlen, die unter einem bestimmten Winkel auf ihn fallen, bildseitig unter dem gleichen Winkel austreten.

Tabelle 1.1. Parameter des Auges

Parameter	
Krümmungsradius (mm)	
Vorderfläche der Hornhaut	7,72
Rückfläche der Hornhaut	6,5
Vorderfläche der Linse	10,2
Rückfläche der Linse	-6
Asphärität	
Vorderfläche der Hornhaut	-0,26
Rückfläche der Hornhaut	0
Vorderfläche der Linse	-3,1316
Rückfläche der Linse	-1
Dicke (mm)	
Hornhaut	0,55
vordere Augenkammer	3,05
Linse	4
Glaskörper	16,4
Brechungsindex	
Hornhaut	1,3672
vordere Augenkammer	1,3374
Linse	1,42
Glaskörper	1,336

**Abb. 1.3.** Vergleich zwischen dem schematischen (oben) und dem reduzierten Auge (unten)

1.2 Grenzen der räumlichen Auflösung des Auges

1.2.1 Auflösungsvermögen (Visus)

Eine Erfahrung vieler Leute im täglichen Leben ist eine begrenzte Qualität des Auges. Als ein natürliches Maß für die Qualität des menschlichen Auges gilt seine Fähigkeit, feine Strukturen in einem Bild zu erkennen, welche *Visus* (Visual Acuity) genannt wird. Unter dem Visus versteht man die Sehschärfe an der Stelle schärfsten Sehens. Beim photopischen Sehen ist die Sehschärfe am größten in der Fovea und nimmt zur Netzhautperipherie ab (Abb. 1.4 rechts). Damit spiegelt sich die räumliche Verteilung der Netzhautzellen wider (Kap. 1.2.4). Beim skotopischen Sehen ist die Sehschärfe im parafovealen Bereich am größten, da dort die Stäbchendichte am höchsten ist. An der Stelle des Sehnervaustritts aus dem Auge ist die Sehschärfe 0 (das ist der sog. „blinde Fleck“).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Sehschärfe zu testen und zu klassifizieren. Für die Sehschärfenbestimmung werden in den meisten Fällen Targets (Visual Charts) verwendet, die die sog. Snellen-Tabellen (in Form eines „E“) oder die Landolt-Ringe (in Form eines „C“) darstellen (Abb. 1.5).

Der Visus V gibt das räumliche Auflösungsvermögen des Auges wieder und wird durch folgende Formel definiert

$$V = \frac{1}{\alpha} [\text{Winkelminuten}^{-1}], \quad (1.2)$$

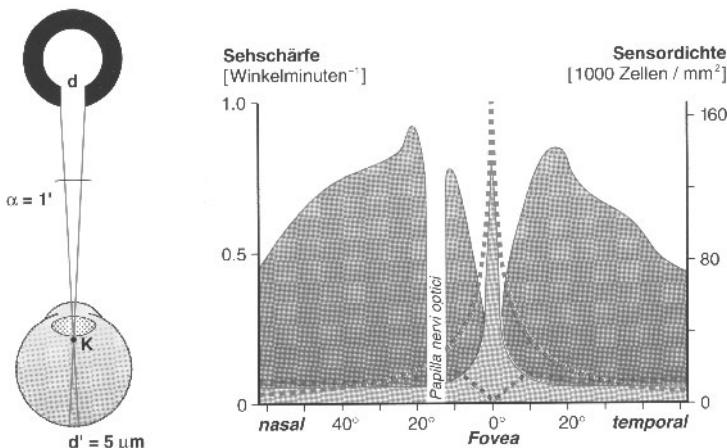


Abb. 1.4. Links: Test der Sehschärfe. Landolt-Ring mit Lücke d und Abbildung d' auf der Netzhaut (Sehwinkel $\alpha = 1'$), K Knotenpunkt. Rechts: Abhängigkeit der Sehschärfe von der Sensordichte der Netzhaut. Photopische und skotopische Sehschärfe sowie Zapfen- und Stäbchendichte. Ausgespart der sensorfreie Bereich des blinden Flecks (Papilla nervi optici, 15° nasal)

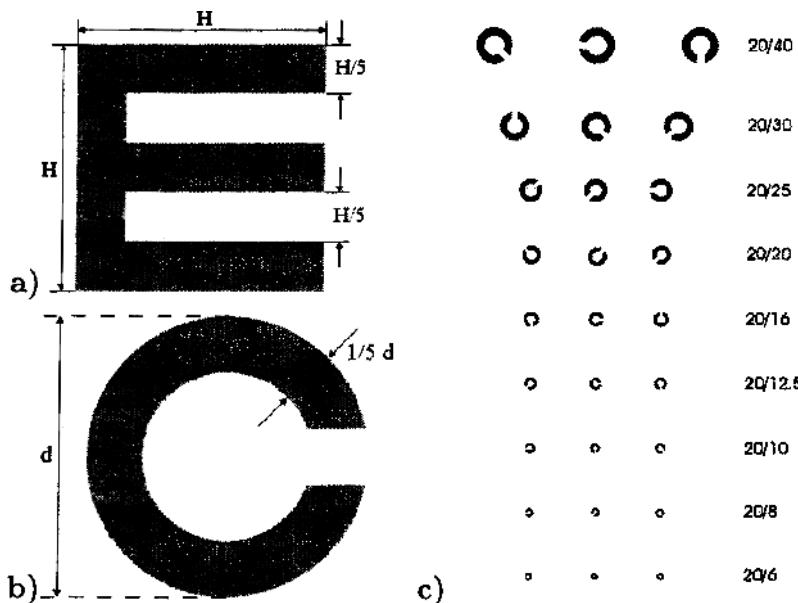


Abb. 1.5. (a) Der Snellen-Buchstabe. (b) Landolt-Ring. (c) Target zur Sehschärfenbestimmung mit Landolt-Ringen

wobei α die Lücke in Winkelminuten ist, die von der Versuchsperson in einem Reizmuster (z.B. Landolt-Ring) gerade noch erkannt wird (Normalwerte bei Jugendlichen zwischen 0,8–1,5').

Der Visus hängt von vielen Faktoren ab. Während bei kleinen Pupillengrößen die Sehqualität durch die Beugungseffekte begrenzt ist (Kap. 1.2.2), kommen die Aberrationen an den Rändern großer Pupillen ins Spiel, z.B. die sphärische Aberration (Kap. 1.2.3). Deswegen ist bei einer Pupillengröße von ca. 3 mm, die beim normalen Tageslicht üblich ist, ein Kompromiss zwischen der Pupillengröße und den Aberrationen zu erzielen. In Abb. 1.6 ist der Zusammenhang zwischen dioptrischer, beugungsbegrenzter und rezeptormosaiklimitierter Auflösung der Netzhaut für den Fall der Abbildung einer Linie schematisch veranschaulicht.

1.2.2 Einfluss der Beugungseffekten

Die Sehschärfe eines perfekten Auges wird schließlich durch die Beugungseffekte begrenzt. Eine immer kleinere Pupille, die immer weniger Lichtstrahlen durchlässt, würde einen immer kleineren Punkt auf der Netzhaut erzeugen. Unterhalb einer bestimmten Aperturgröße wird der Punkt jedoch immer breiter, da an den Rändern der Öffnung Beugungseffekte auftreten. Damit bildet eine runde Apertur einen Punkt als ein Muster konzentrischer, heller und dunkler Ringe ab, in deren Mitte sich ein helles, ausgedehntes

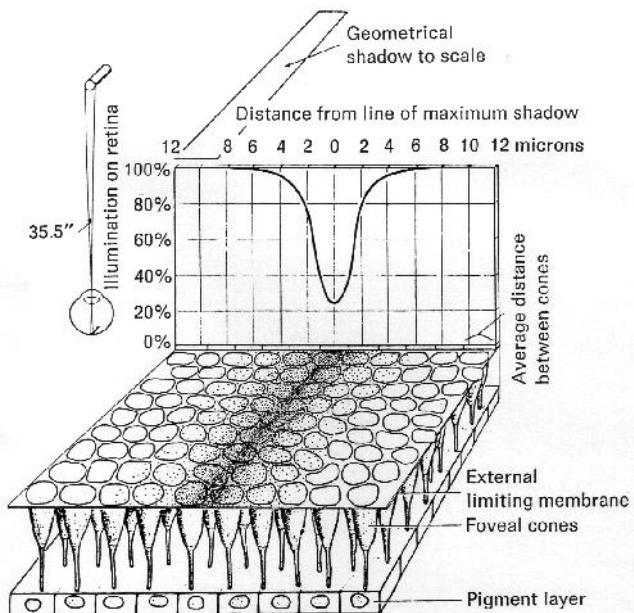


Abb. 1.6. Line-Spread-Funktion (schematisch)

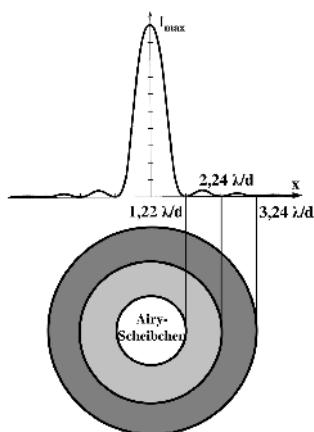


Abb. 1.7. Intensitätsverteilung des Beugungsmusters an einer runden Apertur. Die Position der Minima ist angegeben

Lichtscheibchen (Airy-Scheibchen) befindet (Abb. 1.7). Der Winkel θ des Scheibchens ist durch den Pupillendurchmesser d und die Wellenlänge des Lichts λ bestimmt:

$$\theta = 1.22 \frac{\lambda}{d} \quad (1.3)$$

Dies beeinflußt die maximale Auflösungsgrenze des Auges, da zwei Punkte nur dann unterschieden werden können, wenn die Summe der beiden Bestrahlungsflächen zwei deutliche Maxima aufweisen. Nach dem Rayleigh-Kriterium ist dies dann der Fall, wenn das Maximum der einen genau auf das erste Minimum des anderen fällt. Die Auflösungsgrenze ist dann durch den minimalen Winkelabstand, den beide Punkte haben können, nach (1.3) gegeben.

Dementsprechend können also bei einer Pupille von 3 mm Durchmesser und bei einer Wellenlänge von 555 nm, bei der im Tageslicht die höchste Empfindlichkeit besteht, ca. 47" aufgelöst werden, bei einer Pupille von 4 mm schon ca. 35".

Theoretisch sollte die optische Güte des Auges bei größeren Pupillen zunehmen. Jedoch nimmt sie bei größeren Pupillenradien nicht so zu, wie man dies von der Wellentheorie des Lichts erwarten würde. Wie Abb. 1.8 zeigt, verbessert sich die Sehschärfe tatsächlich, während die Pupille größer wird. Abhängig von der Beleuchtung erreicht sie ein Maximum bei 3–4 mm Pupillendurchmesser. Wenn sich die Pupille noch weiter öffnet, überwiegen die optischen Aberrationen, die im Randbereich stärker vertreten sind, und so wird die gesamte Sehschärfe reduziert. Die Messung der optischen Aberrationen, die als *Wellenfrontfehler* bezeichnet werden, erklärt diese Tatsache.

In Abb. 1.9 wird der Verlauf der mittleren quadratischen Abweichung für die Wellenfront (RMS) abhängig von der Pupillengröße am Beispiel von zwei Augen veranschaulicht. Die RMS erhöht sich ständig mit der immer größer werdenden Pupillengröße. Bei großen Pupillen erreicht die Strehl-Zahl (Kap. 1.3) kleine Werte und kann nicht mehr als ein nützliches Maß der optischen Qualität benutzt werden, weil die dazugehörige PSF (Kap. 1.3) eine komplizierte Form mit vielen Maxima aufweist. In beiden Fällen handelt sich im Wesentlichen um normalsichtige Augen. Die Formänderung der Abweichungen ist jedoch von Patient zu Patient unterschiedlich stark, da die

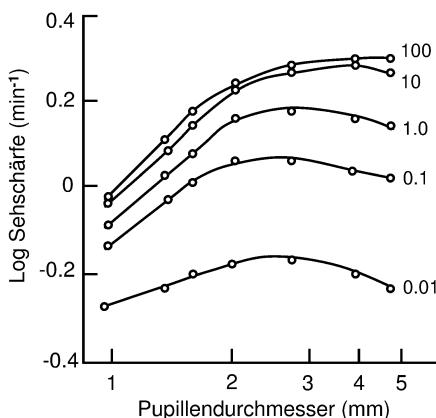


Abb. 1.8. Sehschärfe als Funktion des Pupillendurchmessers [3]. Die Zahlen an den Kurven geben die Beleuchtung der Testtafel in mL an

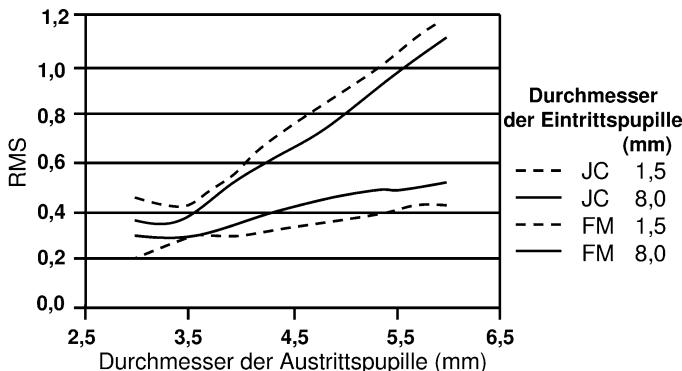


Abb. 1.9. Mittlere quadratische Abweichung der Wellenfront der Augen von zwei Versuchspersonen in Abhängigkeit vom Durchmesser der Pupille

Aberrationen im peripheren Bereich der Pupille weitgehende Unterschiede aufweisen können [12, 14].

1.2.3 Abbildungsfehler des menschlichen Auges

Der dioptrische Apparat des Auges ist kein hochwertiges, korrigiertes Linsensystem, wie es bei modernen optischen Systemen möglich ist. Verschiedene optische Abbildungsfehler (*Abberationen*³), die durch die Elemente des Auges, wie die Hornhaut oder die Linse, verursacht werden, führen zur unscharfen Abbildung und begrenzen damit die Qualität der Abbildung auf der Netzhaut.

Diese biologischen Unzulänglichkeiten können jedoch durch physiologische Korrekturmechanismen wieder ausgeglichen werden. Als Beispiel kann die sphärische Aberration⁴ dienen. In Abb. 1.10 ist die longitudinale sphärische Aberration (LSA) der Hornhaut, der Linse und des gesamten theoretischen Auges dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, besitzt die Hornhaut eine gewisse sphärische Aberration, die mit der gegenwärtigen sphärischen Aberration der Linse kompensiert wird. Zusätzlich kann auch die Pupille die Randstrahlen ausblenden und damit die sphärische Aberration physiologisch vermindern. Auch kurzwelliges Licht wird stärker gebrochen als langwelliges, was unter

³ Optische Aberrationen sind meistens mehr oder weniger regelmäßige Abweichungen, die die optischen Elemente eines realen Systems im Vergleich zu einem idealen System haben. Als Beispiele der Aberrationen seien die sphärische Aberration oder Astigmatismus zu nennen. Die Aberrationen bewirken, daß sich die aus solchen Systemen austretenden Wellen deutlich von einer sphärischen Welle unterscheiden.

⁴ Bei der sphärischen Aberration werden Randstrahlen stärker gebrochen als Strahlen nahe der optischen Achse.

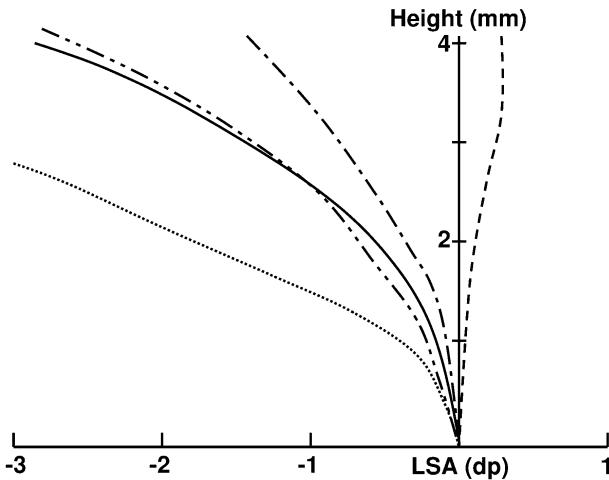


Abb. 1.10. Longitudinale sphärische Aberration (LSA) der Hornhaut (*Strich Punkt*), der Linse (*langer Strich*), des gesamten theoretischen Auges (*Linie*). Die Werte der LSA für das schematische Auge (*Punkt*) und Van-Meeteren-Auge (*Strich Doppeltpunkt*) sind auch dargestellt

dem Begriff chromatischer Aberration bekannt ist. Eine physiologische Korrektur erfolgt hier durch die geringe Blauempfindlichkeit besonders im Bereich des schärfsten Sehens.

Bei einem normalsichtigen Auge wird parallel einfallendes Licht auf einen Punkt auf der Retina fokussiert (*Emmetropie*). Allerdings ist dies bei sehr vielen Menschen nicht der Fall. Die wohl am meisten verbreiteten Fehlsichtigkeiten sind *Myopie* (Kurzsichtigkeit) und *Hyperopie* (Weitsichtigkeit). Bei der Myopie liegt der Brennpunkt parallel einfallender Lichtstrahlen vor der Netzhaut und bei der Hyperopie dahinter. Die Ursachen dieser beiden Fehlsichtigkeiten können in einer falschen Brechkraft des dioptrischen Systems oder in der falschen Achsenlänge des Auges liegen. Eine weitere Fehlsichtigkeit, der sog. *Astigmatismus*, hängt mit der Fehlkümmung der Hornhaut zusammen. Hierbei kommt keine punktförmige Abbildung parallel einfallenden Strahlen auf der Netzhaut zustande. Die Hornhaut ist nicht kugelförmig gekrümmt, und es herrscht in zwei verschiedenen Achsen eine unterschiedliche Brechkraft. Diese Refraktionsanomalien, die in der Aberrometrie als Abbildungsfehler niedriger Ordnung *Defokus* und *Astigmatismus* bezeichnet werden, können mit Hilfe von Brillen oder Kontaktlinsen korrigiert werden [6].

1.2.4 Rezeptorendichte der Netzhaut

Das scharfe Sehen des Menschen ist neben den optischen Aberrationen und der Lichtbeugung an den Rändern der Pupille auch durch die Größe und die Dichte der Photorezeptoren auf der Netzhaut begrenzt. Damit spielen auch

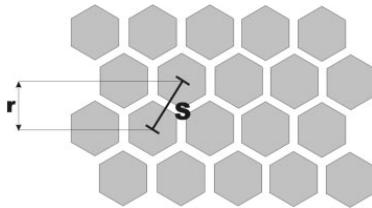


Abb. 1.11. Modell der Photorezeptorenanordnung

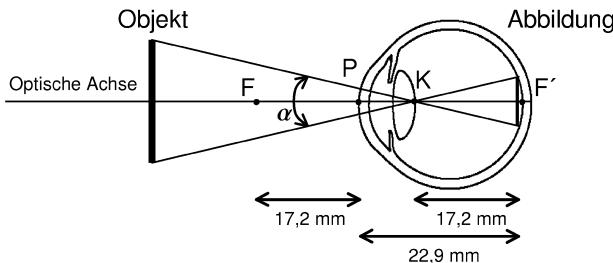


Abb. 1.12. Das Modell des reduzierten Auges nach Listing [5]

die Feinheiten des retinalen Mosaiks der Photorezeptoren für die Auflösungsgrenze des Auges eine wichtige Rolle.

Die für das Tagessehen zuständigen Zapfen haben die größte Dichte in der Fovea, während die für das Sehen bei Dämmerung und das Nachtsehen verantwortlichen Stäbchen am dichtesten parafoveal (ca. 15° Sehwinkel außerhalb der Fovea) angeordnet sind (Abb. 1.4 rechts). Die Dichte der Photorezeptoren beträgt in der Fovea ca. $147\,000 \text{ Zapfen/mm}^2$. Der mittlere Durchmesser der Rezeptoren liegt bei $2 \mu\text{m}$, der Abstand zwischen ihnen ist ca. $3 \mu\text{m}$.

Wir nehmen an, dass die Rezeptoren ungefähr sechseckig und so verpackt sind, wie in Abb. 1.11 gezeigt ist. Laut Nyquist-Theorem ist die maximale Frequenz, die durch diese Verteilung offenbar unterschieden werden kann, gleich

$$f_N = \left(\sqrt{3} S \right)^{-1}, \quad (1.4)$$

wobei S der Abstand zwischen den Rezeptoren ist.

Nach dem Modell des reduzierten Auges (Abb. 1.12) mit dem minimalen Zapfenabstand in der Fovea $S = 2,5 \mu\text{m}$ erhalten wir entsprechend (1.4) für das Auflösungsvermögen der Netzhaut einen Wert von etwa $f_N = 69 \text{ cpd}$, d.h., die Bestimmung der Position eines Landolt-C sollte dann möglich sein, wenn der Abstand $0,4\text{--}0,5'$ beträgt (entsprechend Visus 2,3 oder 20/8).

1.3 Optische Qualität des Auges

Ein abbildendes optisches System wie das Auge kann gut mit der linearen Systemtheorie beschrieben werden. Sind f und g jeweils die Eingangs- und Ausgangsfunktionen eines linearen Systems, so kann dessen Wirkung durch einen linearen Operator \mathcal{L} beschrieben werden:

$$f(x, y) \mapsto g(X, Y) \quad \Rightarrow \quad g(X, Y) = \mathcal{L}\{f(x, y)\}. \quad (1.5)$$

Mit Hilfe des bei linearen Operatoren gültigen Superpositionsprinzips und den Eigenschaften der Delta-Funktion gelangt man zu einer Darstellung, die es ermöglicht, die Antwort des Systems auf ein δ -förmiges Eingangssignal zu definieren:

$$\begin{aligned} g(X, Y) &= \mathcal{L} \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x', y') \delta(x' - x) \delta(y' - y) dx' dy' \right\} \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x', y') \mathcal{L}\{\delta(x' - x) \delta(y' - y)\} dx' dy'. \end{aligned} \quad (1.6)$$

Dabei ist $\delta(x)$ die Delta-Funktion.

Die Anwendung des linearen Operators auf die Delta-Funktion heißt auch *Impulsantwort*. Wie die lineare Systemtheorie hier angewendet werden kann, hängt wesentlich von der Beleuchtung ab. Man unterscheidet zwei Fälle:

- *Kohärente Beleuchtung*. Die Objektpunkte werden mit kohärentem Licht beleuchtet. Das optische System ist dann linear in der Phase. In diesem Fall nennt man die Impulsantwortfunktion *Punktverwaschungsfunktion* (Point Spread Function, PSF).
- *Inkohärente Beleuchtung*. Die Objektpunkte werden mit inkohärentem Licht beleuchtet. In diesem Fall ist das optische System linear in der Intensität; man spricht von *Amplitudenverwaschungsfunktion* (Amplitude Spread Function, ASF).

Ausgehend vom inkohärenten Fall und unter der Annahme eines raum- und zeitinvarianten Systems gilt

$$g(X, Y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \text{PSF}(X - x, Y - y) dx dy. \quad (1.7)$$

Dies stellt eine Faltung der Objektfunktion mit der Impulsantwort, der PSF, dar, d.h. $g = f \otimes \text{PSF}$. Die PSF „verwässt“ das Bild, weil scharfe Linien oder Punkte mit ihr verbreitert werden, und so wird die Auflösung reduziert (Abb. 1.13).

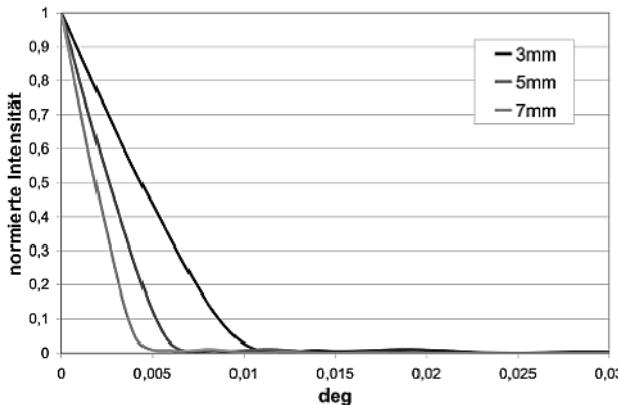


Abb. 1.13. Punktverwachungsfunktionen (PSF) für Pupillengrößen von 3, 5 und 7 mm Durchmesser ohne Aberrationen

Wendet man nun das bekannte Faltungstheorem der Fourier-Transformation an, so ergibt sich für die Fourier-Transformierte

$$G(\xi, \eta) = \text{OTF}(\xi, \eta)F(\xi, \eta). \quad (1.8)$$

Dabei bezeichnen F und G jeweils die Fourier-Transformierten von f bzw. g . Die Fourier-Transformierte der PSF wird als *optische Transferfunktion* (Optical Transfer Function, OTF) bezeichnet. Eine optische Abbildung kann also als Filterung im Ortsfrequenzraum verstanden werden.

Da es sich bei der OTF um eine komplexe Funktion handelt, kann sie in Betrag und Phase aufgeteilt werden. Der Amplitudenanteil (Absolutwert) der OTF heißt *Modulationtransferfunktion* (MTF)

$$\text{MTF}(\xi, \eta) = |\text{OTF}(\xi, \eta)|. \quad (1.9)$$

Die MTF beinhaltet die Informationen über die Wirkung des Systems im Frequenzraum und ist ein Maß für die Kontrastverringung von Raumfrequenz im Bild durch das System im Vergleich zum Objekt (Abb. 1.14). Analog dazu nennt man den Phasenanteil der OTF *Phasentransferfunktion* (PTF). Sie gibt die relative Phasenverschiebung jedes räumlichen Frequenzterms an. Die gesamte OTF kann also folgendermaßen aufgespaltet werden:

$$\text{OTF} = (\text{MTF})e^{i(\text{PTF})}. \quad (1.10)$$

Die Zusammenhänge der Fourier-Optik sind in Abb. 1.15 für den kohärenten und inkohärenten Fall graphisch dargestellt.

Eine weitere wichtige Funktion für die Beschreibung der optischen Qualität eines optischen Systems ist die Strehl-Zahl (Strehl-Ratio). Sie ist der Quotient aus der maximalen Intensität der PSF des aberrierten Systems und dem entsprechenden Maximum für ein ideales System mit denselben

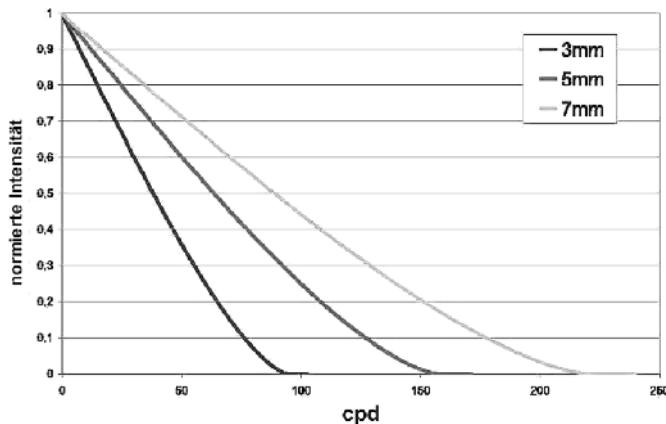


Abb. 1.14. Modulationtransferfunktionen (MTF) für Pupillengrößen von 3, 5 und 7 mm Durchmesser ohne Aberrationen

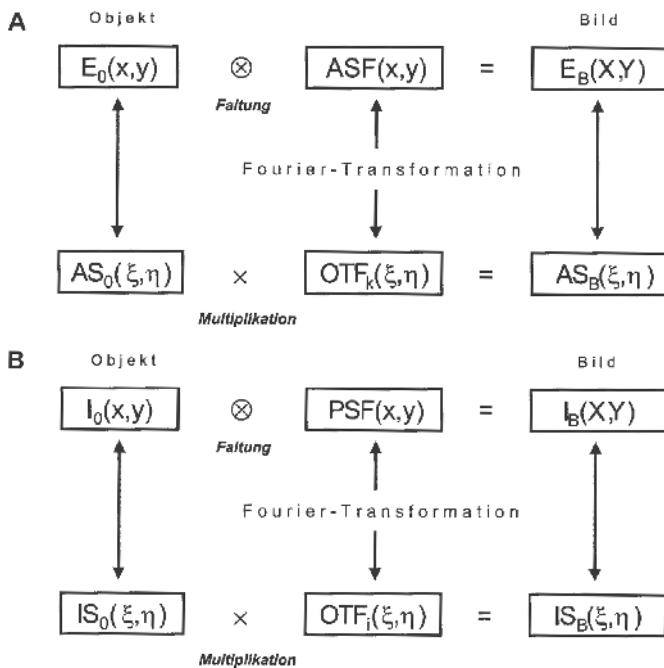


Abb. 1.15. Fourier-Optik in der kohärenten (**A**) und inkohärenten (**B**) Abbildung

Eigenschaften, aber ohne Aberrationen (beugungsbegrenztes System⁵). Für die Berechnung im Fall der kleinen Aberrationen wird oft als Näherung die Maréchal-Formel genommen

$$S = e^{-\sigma^2}. \quad (1.11)$$

Dabei bedeutet σ^2 die Varianz der Phasenaberration in der Pupille.

1.4 Hornhauttopographie

Die Hornhaut ist die am stärksten brechende Fläche im menschlichen Auge. Mit ihrer Brechkraft von 43 dpt trägt sie fast 73% zur gesamten Brechkraft des Auges (59 dpt) bei. Deswegen spielt sie eine wichtige Rolle bei der Abbildung eines Objekts auf die Retina, und so haben schon kleine Änderungen an der Hornhaut eine starke Wirkung auf die Sehqualität.

Mittels der Hornhauttopographie kann die Form der Hornhaut detailliert vermessen und ihre optischen Eigenschaften analysiert werden. Sie findet ihre Anwendung bei refraktiven Eingriffen an der Hornhaut zwecks Sehverbesserung (LASIK, PRK). Bei solchen Operationen wird die Hornhautform vor und nach der Operation vermessen, um die Operationsplanung durchzuführen, das Komplikationsrisiko einzuschätzen und die Effektivität der Operation zu beurteilen. Sie wird auch zur Abklärung von Sehbeschwerden und zur Anpassung von Kontaktlinsen herangezogen. Andere Gebiete, in denen die Hornhauttopographie benötigt wird, sind die Abschätzung intraokulärer Operation (Kataraktoperation), postoperative Überwachung nach einer Hornhauttransplantation (Keratoplastik), Diagnostik und Detektion von pathologischen Hornhautkrankheiten.

1.4.1 Messmethoden

Es existieren verschiedene Methoden für die Messung der Hornhauttopographie, die im Folgenden kurz beschrieben werden. In Tabelle 1.2 sind einige kommerziell vorhandenen Topographiegeräte aufgelistet.

Keratometer (Ophthalmometer). Die einfachste Möglichkeit, den Krümmungsradius entlang einer Achse zu bestimmen, ist der Keratometer [17]. Dabei wird die Eigenschaft der Hornhaut benutzt, da sie einem konvexen Spiegel ähnlich ist.

⁵ Beugungsbegrenzte Systeme transformieren divergente sphärische Wellen in konvergente, perfekt sphärische Wellen. Sie konvergieren zu einem idealen Punkt auf der Bildebene (die Mitte des Airy-Scheibchens, Abb. 1.7). Damit ist die Beugung an den Rändern der Öffnung der einzige limitierende Faktor der Bildqualität in diesen optischen Systemen.

Tabelle 1.2. Einige kommerziell vorhandenen Topographiegeräte

Messprinzip	Gerätename	Hersteller
Videokeratographie	ATLAS	Zeiss Humphrey Systems
	EyeSys 2000	EyeSys Vision
	TMS	Tomey Corporation
Slit-Scanning-Photographie	Orbscan II	Bausch & Lomb
Rasterphotogrammetrie	PAR CTS	PAR Vision Systems Corporation
Interferometrie	ET-800	Euclid Systems Corporation

Es gibt zwei Arten von Keratometern, die sich in ihrer Arbeitsweise unterscheiden: den Keratometer von Helmholtz und den Keratometer von Javal-Schiötz.

Im Keratometer von Helmholtz wird die Bildgröße bei konstant gehaltener Objektgröße gemessen. Bei der Messung werden zwei Marken, deren Abstand bekannt ist, auf die Hornhaut projiziert und die Strecke zwischen den virtuellen Bildern gemessen. Diese Strecke kann in den Krümmungsradius in diesem Meridian konvertiert werden.

Im Javal-Schiötz-Keratometer wird die Bildgröße konstant gehalten und die Objektgröße variiert. Zwei farbige Lichtfiguren werden auf die Hornhaut projiziert und die Reflexion an einem Schirm beobachtet. Die Figuren werden so lange verschoben, bis das Reflexionsbild eine bestimmte Größe erreicht hat. Danach wird die Strecke zwischen Hornhaut und Objekt auf der Skala abgelesen und der Krümmungsradius errechnet.

Der Krümmungsradius der Hornhaut kann in die Brechkraft P umgerechnet werden:

$$P = \frac{n - 1}{r} = \frac{1,3375 - 1}{r} = \frac{0,3375}{r}, \quad (1.12)$$

wobei P die Brechkraft (in dpt), n der Brechungsindex der gesamten Hornhaut ($n = 1,3375$) und r der Krümmungsradius (in m) ist [10].

Mit einem Keratometer können Astigmatismus und Defokus für die zentrale Hornhautregion von 3 mm Durchmesser ermittelt werden. Die wichtigste Einschränkung des Keratometers ist die Annahme, dass die Hornhaut eine sphärozylindrische Form mit gleichem Krümmungsradius in jedem Meridian aufweist und die Zylinderachsen sich unter 90° kreuzen.

Videokeratographie. Mit einem Videokeratographen wird im Vergleich zum Keratometer detailliertere Information über einen größeren Bereich der Hornhaut gewonnen [4].

Der Hauptbestandteil eines Videokeratographen ist ein Target, das aus konzentrisch angebrachten weißen und schwarzen Ringen besteht (Abb. 1.16). Dieses Target wird beleuchtet und auf die Hornhaut projiziert. So entsteht ein Hornhautreflex, der mit einer Videokamera aufgenommen wird.



Abb. 1.16. EyeSys System 2000 – der Videokeratograph von EyeSys Vision

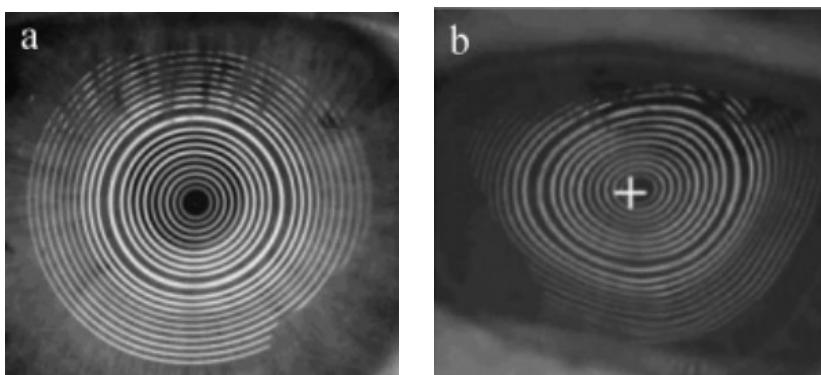


Abb. 1.17. Abbildung der Ringmuster auf der Hornhaut: (a) normale Hornhaut, (b) astigmatische Hornhaut

Wenn die Hornhaut sphärisch ist, liegen die Ringe auf dem digitalen Bild konzentrisch und äquidistant (Abb. 1.17a). Sie rücken aber näher aneinander und werden schmäler, wenn die Hornhaut steiler wird, was eine größere Brechkraft der Hornhaut verglichen mit einer Sphäre anzeigt. Wenn die Hornhaut flacher ist, liegen die Ringe auf dem Bild weiter von einander entfernt und werden dicker. Wenn Astigmatismus vorhanden ist, ändert sich die Form der Targetringe zu einer elliptischen Form (Abb. 1.17b). Lokale Änderungen der Hornhautform, wie z.B. Irregularitäten, verursachen Verzerrungen in den Regionen, in denen sie vorhanden sind.

Zur Rekonstruktion der dreidimensionalen Hornhautform aus dem zweidimensionalen Digitalbild wird ein mathematischer Algorithmus mit einigen Annahmen benutzt. Die Größe und Verzerrung der Ringmuster auf der Hornhaut sind der Ausgangspunkt für die Rekonstruktion der Hornhautform. Die Position der Ringe relativ zum Zentrum des Ringmusters bestimmt die ra-

diale Strecke. Die Größe der Ringe und die Strecke zwischen den Ringen bestimmen den Krümmungsradius.

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Videokeratographen liegt innerhalb von 0,25 dpt für die zentrale Hornhaut. Die Auflösung ist durch die Anzahl von Messpunkten bestimmt, die durch die Ringanzahl und die Zahl der Meridiane, in denen ihre Position analysiert wird, festgelegt ist.

Die Videokeratographen haben ein relativ großes Messfeld auf der Hornhaut (8–10 mm im Durchmesser), aber ihnen fehlen Messdaten für den zentralen Bereich der Hornhaut (1,5 mm oder mehr), da zum einen die Videokamera in der Mitte des Ringmusters angebracht wird und zum anderen die Ringe nicht beliebig klein gemacht werden können. Dies erfordert eine Extrapolation und Approximation der Messdaten in dieser Hornhautregion. Die dabei verwendeten mathematischen Modelle sind angemessen für eine normale Hornhaut, können aber einen möglichen Fehler bei einer abnormalen oder postoperativen Hornhaut verursachen.

Die Videokeratographie ist die am weitesten verbreitete und am meisten benutzte Messtechnik der Hornhauttopographie in der klinischen Praxis.

Slit-Scanning-Photographie. Bei dieser Methode wird ein schmaler Lichtstrahl einer Spaltlampe verwendet, um in einem Meridian ein lokales Profil der Hornhautfläche zu messen⁶. Dabei tasten zwei Spaltlampen das Auge ab, die um einen Winkel von 45° links und rechts von der Instrumentachse positioniert sind. Das diffuse Streulicht aus der Hornhaut wird mit einer Kamera aufgenommen und dazu benutzt, die Höhendaten zu berechnen. Insgesamt werden 40 Aufnahmen (20 von rechts und 20 von links) gemacht, und danach wird diese Reihe von „Hornhautschnitten“ zusammengeführt, um die Hornhautform zu rekonstruieren. Zusätzlich kann auch die hintere Hornhautfläche gemessen und damit die Hornhautdicke ermittelt werden.

Einschränkungen dieser Technologie sind die relativ lange Messzeit (1,5 s), die für die Bildaufnahmen benötigt wird, und mögliche Störungen durch Augenbewegungen.

Rasterphotogrammetrie. In diesen Systemen wird ein Gitter auf die Hornhaut projiziert und das diffus gestreute Licht aus einem bekannten Winkel detektiert [15]. Da die normale Hornhaut transparent ist und somit kaum Licht streut, wird ein Fluoreszin auf den Trennfilm der Hornhaut aufgetragen und eine anregende Beleuchtungsquelle benutzt, um Gittermuster auf der Hornhaut zu erzeugen. Die topographische Höhe (Erhebung) wird aus der Gitterverzerrung berechnet, indem die Verschiebungen der Gitterpunkte auf der Hornhautoberfläche gegenüber ihren Positionen aus der Referenzaufnahme (Projektion des Gitters auf eine ebene Fläche) bestimmt werden

⁶ Die ausführliche Information über Orbscan II kann im Internet gefunden werden: <http://www.orbscan.com>

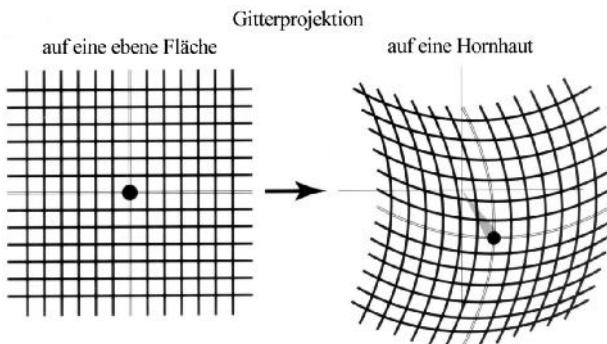


Abb. 1.18. Das Prinzip der Rasterphotogrammetrie. (Die Abbildung ist aus [4] entnommen)

(Abb. 1.18). Die Anzahl der Messpunkte ist durch die Anzahl von Gitterpunkten begrenzt.

Das Benutzen von Fluoreszin bei der Messung ist nicht ganz ideal, da nicht bekannt ist, wie es die normale Dicke und Verteilung des Trennfilms auf der Hornhaut verändert.

Moiré-Interferometrie. Zwei Serien von parallelen Linien werden aus verschiedenen Winkeln auf die Hornhaut projiziert (Abb. 1.19). Die Abbildung des linken und rechten Projektionssystems auf der Hornhaut stellt eine Reihe von gekrümmten Linien dar, die von einer Kamera aufgenommen und miteinander überlagert werden, wodurch Moiré-Interferenz auftritt. Ringförmige Linien, deren Breite durch die räumliche Frequenz des Liniengitters bestimmt ist, stellen die Linien gleicher Höhe dar und können ohne Rekonstruktion durch mathematische Modelle direkt angezeigt werden [9].

Wellenfrontanalyse mit dem Hartmann-Shack-Sensor (HSS). Das Patientenauge wird so positioniert, dass eine ebene Wellenfront mit Hilfe eines Objektivs im Krümmungsmittelpunkt der Hornhaut fokussiert wird (Abb. 1.20). Weist die Hornhaut eine ideale sphärische Form auf, werden die Strahlen an jedem Punkt der Hornhaut in sich selbst zurückreflektiert, und auf einem CCD-Chip liegen die Fokuspunkte von jeder Sublinse eines Linsenarrays äquidistant. Falls Abweichungen von der sphärischen Form auftreten, werden sie in der Wellenfront gespeichert, und auf dem CCD-Chip können die Verschiebungen der Fokuspunkte beobachtet werden. Aus einem mit einer Videokamera aufgenommenen Muster werden Verschiebungen der Fokuspunkte einer aktuellen Wellenfront gegen die Fokuspunkte einer ebenen Wellenfront bestimmt, die in diesem Fall eine Referenz darstellt, und aus diesen Verschiebungen wird die aktuelle Wellenfront und die Hornhautform rekonstruiert. Eine ausführliche Beschreibung des Hartmann-Shack-Wellenfrontsensors [11] ist in Kap. 1.5.1 zu finden.

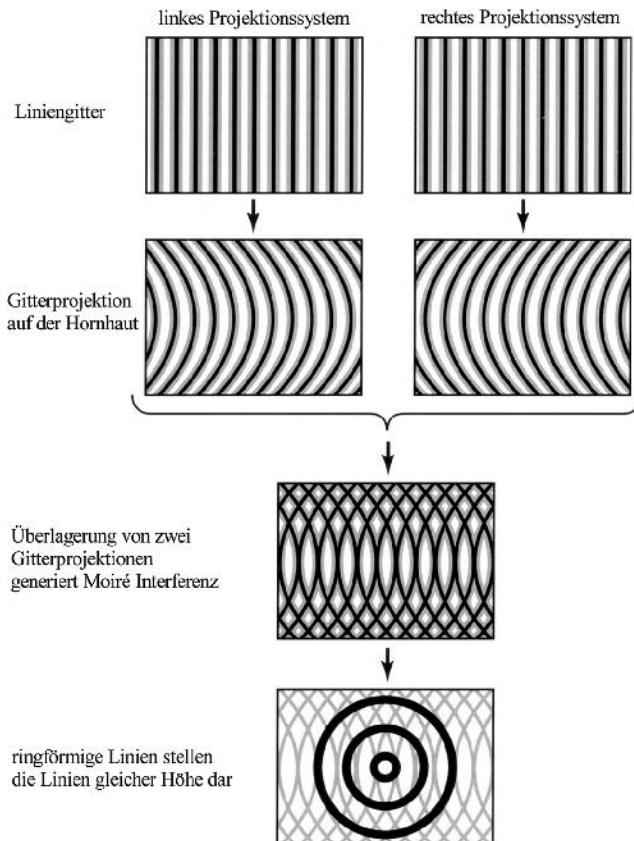


Abb. 1.19. Das Prinzip der Moiré-Interferometrie. (Die Abbildung ist aus [4] entnommen)

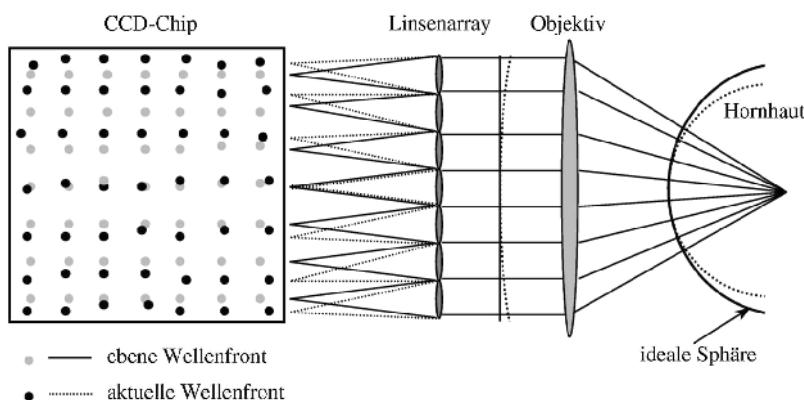


Abb. 1.20. Das Prinzip der Hornhauttopographiemessung mit einem Hartmann-Shack-Wellenfrontsensoren

1.4.2 Darstellung der Hornhauttopographie

Die Hornhauttopographie wird als eine Karte in zwei Dimensionen dargestellt und die dritte Dimension (Krümmung, Erhebung, Brechkraft, usw.) mit Farbe so kodiert, dass Bereiche mit gleichen Werten gleiche Farbe haben (Abb. 1.21). Die Farbpaletten variieren von einem Gerät zum anderen, was einen direkten Vergleich der Daten oft erschwert.

Es gibt eine Anzahl von Ansichten und statistischen Indizes, mit denen die Hornhautform beschrieben wird und die Informationen bezüglich optischer Qualität der Hornhaut und der Sehqualität liefern [8]. Es besteht aber keine eindeutige Übereinstimmung zwischen den Ansichten- und Indexbezeichnungen bei verschiedenen Herstellern.

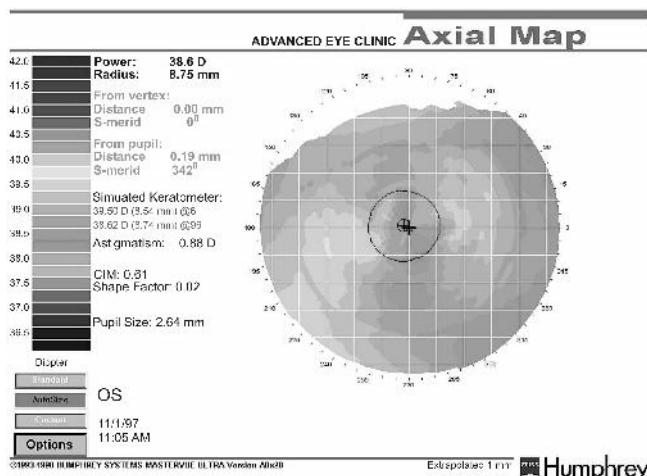


Abb. 1.21. Axiale Ansicht einer Hornhaut

1.4.3 Ausblick

Der Anstoß für eine präzise und detaillierte Darstellung der Hornhauttopographie wurde durch die rasche Entwicklung der refraktiven Chirurgie gegeben, und heute ist die Hornhauttopographie ein wichtiger Bestandteil der Hornhautdiagnostik geworden.

Moderne Hornhauttopographen liefern sowohl qualitative als auch quantitative Information über die Hornhautform für einen großen Bereich der Hornhaut, und Computerprogramme ermöglichen es, einen geplanten chirurgischen Eingriff zwecks Sehkorrektur zu simulieren oder die Kontaktlinsen auf die Hornhautform anzupassen.

Die Hornhauttopographie erlaubt ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen der Hornhautform, der optischen Aberrationen und der

Sehqualität. Oft hilft sie festzustellen, ob Probleme und Sehbeschwerden an der Hornhaut oder an der inneren Augenoptik liegen.

1.5 Aberrometrie

Die Aberrometrie ist eine neue Methode zur Vermessung der optischen Fehler des Auges [13]. Sie kann dabei nicht nur klassische Refraktionswerte wie Sphäre und Astigmatismus mit zuvor unerreichter Genauigkeit messen, sondern auch die Refraktion über die Pupille ortsauflöst bestimmen. Dies kann dann in Aberrationen höherer Ordnung wie Koma, sphärische Aberrationen höherer Ordnung oder Dreiwelligkeit angegeben oder als Wellenfront dargestellt werden.

Bei der Aberrometriemessung wird die Form einer Wellenfront nach Austritt aus dem Auge gemessen, wie sie ausgehend von einem Lichtpunkt auf der Netzhaut das ganze Auge durchquerend entsteht.

Hierdurch werden die gesamten Aberrationen des optischen Systems aufgenommen, unabhängig von ihrer Entstehungsursache. Auf die Quelle der Aberrationen (z.B. Hornhautform, Linsenform, Augenlänge) kann dabei jedoch höchstens indirekt geschlossen werden. Dies ist aber kein großer Nachteil, da dieses Wissen für eine Operation zur Korrektur der Sehfehler nicht nötig ist.

1.5.1 Messmethoden

In den letzten Jahren haben sich Wellenfrontsensoren zur Vermessung der Aberrationen des menschlichen Auges durchgesetzt. Dabei gibt es drei verschiedene Arten von Wellenfrontsensoren, die in verschiedenen Ausführungen auf dem Markt erhältlich sind:

- Tscherning-Aberrometer (WaveLight, Schwind),
- Ray-Tracing-Geräte (TRACEY),
- Hartmann-Shack-Sensoren (z.B. Bausch & Lomb, VISX, Zeiss).

Tscherning-Aberrometer. Abbildung 1.22 zeigt schematisch die Funktionsweise eines Tscherning-Aberrometers. Ein Laserstrahl wird durch eine Aperturmaske in viele Teilstrahlen zerlegt. Diese Teilstrahlen werden dann durch das Auge auf die Netzhaut abgebildet. Mit einer Ophthalmoskoplinse kann das Bild auf der Netzhaut betrachtet und die Form des Punktmusters mit dem ursprünglichen Aperturmuster verglichen werden. Aus der Abweichung vom Idealbild wird so auf die Aberrationen des Auges geschlossen.

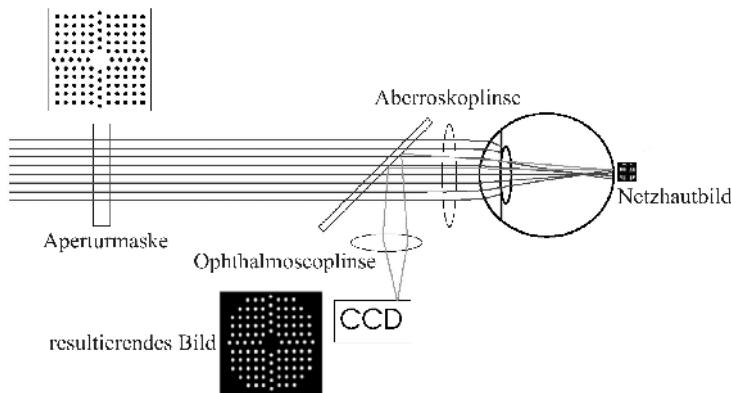


Abb. 1.22. Tscherning-Aberrometer

Ray-Tracing-Sensor. Abbildung 1.23 stellt die Funktionsweise eines Ray-Tracing-Sensors dar. Bei diesem Verfahren wird mit einem dünnen Strahl an verschiedenen Positionen paraxial ins Auge gestrahlten. An jeder Einstrahlposition wird mit einem PSD (Positioning Sensing Detector) die Auftreffposition auf der Netzhaut bestimmt. Bei einem Auge mit perfekter Optik treffen alle Strahlen an die gleiche Stelle, bei aberrierten Augen sind die Punkte gegeneinander verschoben. Aus den Verschiebungen kann nun auf die Aberrationen des Auges geschlossen werden.

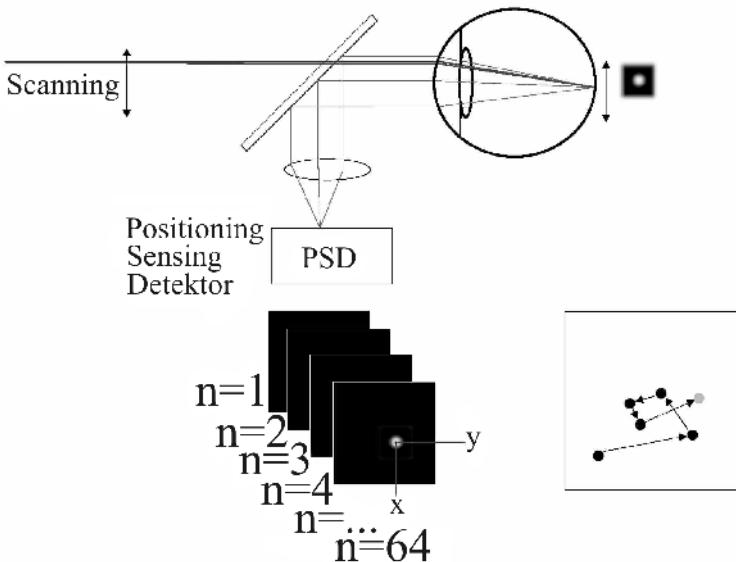


Abb. 1.23. Ray-Tracing-Sensor

Hartmann-Shack-Sensor (HSS). Der am weitesten verbreitete Typ von Wellenfrontsensoren in der Augenheilkunde ist der Hartmann-Shack-Sensor (Abb. 1.24), weshalb er hier auch etwas ausführlicher erläutert wird.

Bei diesem Sensor wird mit einem Laser oder einer Superluminiszenzdiode (SLD) ein Lichtpunkt auf die Netzhaut projiziert. Dieser Lichtpunkt dient als Lichtquelle für die eigentliche Messung. Ausgehend von diesem Punkt durchqueren Strahlen das Auge und verlassen es durch die Hornhaut. Die Wellenfront des Strahls vor dem Auge wird nun mit dem Sensor gemessen [11].

Der Sensor selbst besteht aus einer Anordnung von Mikrolinsen, in deren Brennebene sich eine Kamera (CCD) befindet. Jede Mikrolinse fokussiert einen Teil des Strahls auf den CCD-Chip. Die Position des Fokuspunkts hängt nun von dem Einfallswinkel des Strahls ab (Abb. 1.25).

Je stärker die Wellenfront geneigt ist, desto stärker verschiebt sich der Fokuspunkt aus der optischen Achse. Aus der Betrachtung der Gesamtheit aller Einzelverschiebungen kann nun auf die Form der Wellenfront geschlossen werden. Die Verkippung an der Position der Mikrolinse ist nun gerade $d = f \tan(\alpha)$.

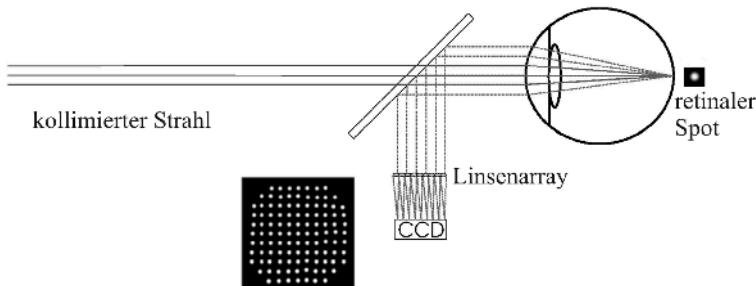


Abb. 1.24. Hartmann-Shack-Sensor

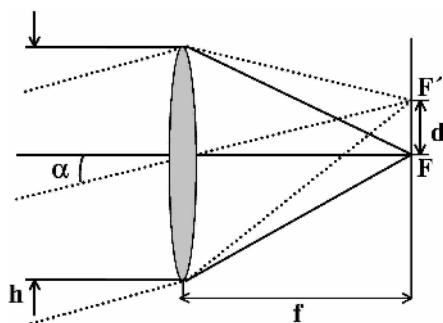


Abb. 1.25. Die Position des Fokuspunkts hängt von der Steigung der Wellenfront ab

1.5.2 Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt bei den verschiedenen Geräten in sehr ähnlicher Weise. Hier werden am Beispiel des WaveScan die verschiedenen Größen vorgestellt.

Abbildung 1.26 zeigt den Ergebnisbildschirm des WaveScan, der die wichtigsten Ergebnisse zusammenfasst. In der obersten Zeile werden die klassischen Refraktionswerte für eine wählbare Pupillengröße (hier 4 mm) angezeigt. Da die Werte von der Pupillengröße abhängen können, kann die Anzeige für Pupillengrößen von 3–6 mm verändert werden. Standardmäßig wird dabei eine 4-mm-Pupille angezeigt, da dieses etwa der natürlichen Pupillengröße bei Tageslicht entspricht und so die Ergebnisse mit denen von klassischen Refraktionsmessungen verglichen werden können. Dazu werden 4 Abbildungen angezeigt, die eine Übersicht über die Messergebnisse geben. Oben links befindet sich eine Wellenfrontkarte der Gesamtaberration, darunter eine Abbildung der Wellenfrontfehler höherer Ordnung, also nach Korrektur von Sphäre und Astigmatismus. Rechts oben werden die Zernike-Koeffizienten angezeigt, und darunter wird ein Bild der Punktverwaschungsfunktion (Point Spread Function, PSF) wiedergegeben.

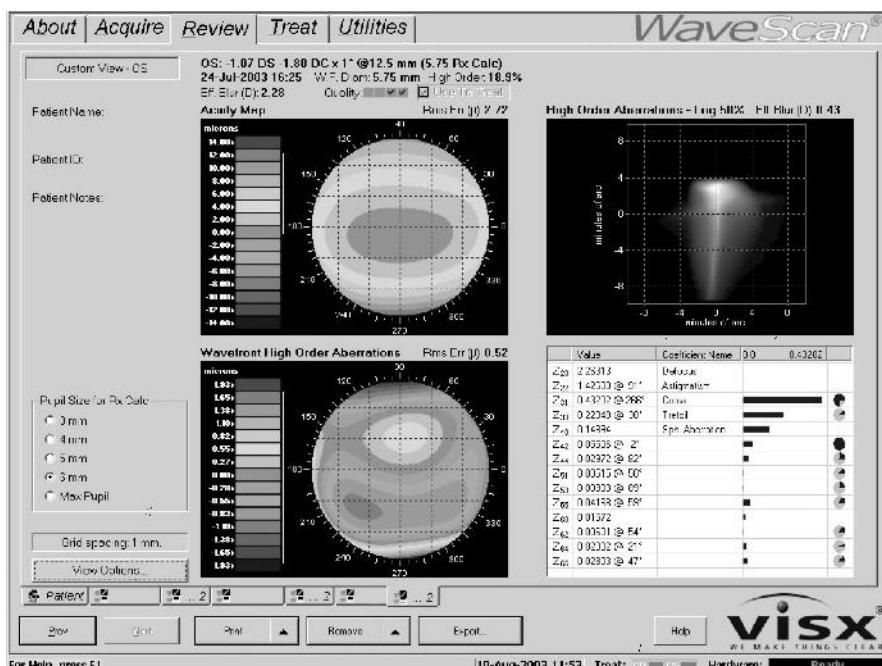


Abb. 1.26. Darstellung der Aberrationen im WaveScan-Programm

Zernike-Koeffizienten. Aus den Messdaten werden in einem ersten Schritt die ersten 27 Zernike-Koeffizienten berechnet. Sie geben an, wie stark die einzelnen Zernike-Polynome (s. Kap. 1.6) an der Wellenfront beteiligt sind. Hierdurch können die optischen Fehler in Arten wie Koma und sphärische Aberration höherer Ordnung aufgeteilt werden.

In der hier gewählten Darstellung (Abb. 1.26, rechts oben im Bild) werden gleichartige Zernike-Koeffizienten durch Berücksichtigung ihrer Winkeleigenschaften zusammengefasst (z.B. die zwei Koma-Terme). Der Winkel ist hier rechts neben den Beträgen graphisch dargestellt.

Aus den Zernike-Koeffizienten können alle anderen Größen hergeleitet werden. Sie beinhalten alle Informationen der Wellenfront, sind aber relativ schwierig zu deuten.

Wellenfrontkarte (Acuity Map). Die Wellenfrontkarte gibt die Abweichung in μm zwischen der gemessenen und einer perfekt ebenen Wellenfront an, welche als Ideal angesehen wird. Das Koordinatensystem ist dabei so gewählt, dass sie eine Draufsicht auf das Auge des Patienten bietet.

Der Mittelpunkt der Darstellung (Abb. 1.26, links im Bild) wird als Referenz genommen und ist daher immer grün. Liegt die Wellenfront im Außenbereich zurück, so wird dies auf der Karte mit Blautönen dargestellt, eilt sie voran, so wird dies mit Rottönen dargestellt.

Bei Kurzsichtigkeit liegt daher eine Rotfärbung des Außenbereiches vor, bei Weitsichtigkeit eine Blaufärbung. Alle Höhenangaben sind dabei in μm .

Die Gesamtwellenfront wird meistens von Sphäre und Astigmatismus dominiert, der Anteil der höheren Ordnungen am Wellenfrontfehler beträgt in diesem Beispiel gerade 12,3% („High Order“). Daher wird im unteren Bild der durch höhere Ordnungen verursachte Wellenfrontfehler noch einmal getrennt dargestellt.

Die Wellenfrontkarte lässt auch schon eine Abschätzung auf die Behandlung zu. Näherungsweise muss bei einer LASIK das Dreifache der Wellenfronthöhe an Hornhautmaterial entfernt werden, um den Sehfehler zu korrigieren (bei gleicher Behandlungsgröße). Das Entfernen von $1\mu\text{m}$ Hornhautgewebe ändert in diesem Volumen die Brechkraft von $n \approx 1,33$ auf $n = 1$ und verkürzt den optischen Weg damit um etwa $0,3\mu\text{m}$.

RMS. Die mittlere Stärke des Wellenfrontfehlers wird als RMS-Wert (RMS: Root Mean Square) angegeben. Im Beispiel in Abb. 1.26 befinden sich rechts über den Bildern die RMS-Werte. Sie geben die mittlere quadratische Abweichung der Wellenfront von einer ebenen Welle in μm an. Dies kann als schnell überschaubares Maß genommen werden, um die Stärke verschiedenartiger Wellenfronten zu vergleichen.

Zur Orientierung: 0,8 D reine Sphäre rufen einen RMS von etwa $1\mu\text{m}$ hervor. Bei einem durchschnittlichen Auge liegt der durch die höheren Ord-

nungen verursachte RMS etwa zwischen $0,15 \mu\text{m}$ und $0,3 \mu\text{m}$. Übersteigt der RMS diese Werte deutlich, so wird die Sehfähigkeit eingeschränkt.

PSF. Die Punktverwaschungsfunktion (PSF: Point Spread Function) gibt an, wie ein Punkt aus dem Unendlichen durch die Optik des Auges auf die Netzhaut abgebildet wird (Abb. 1.27). Das Bild entspricht also dem Bild eines Sterns auf der Netzhaut. Um dieses Bild zu interpretieren muss man sich klar machen, dass eine Sehstärke von 100% einer Auflösung von 1 Bogenminute gleichkommt. Die Größe des abgebildeten Punkts lässt also direkte Abschätzungen der maximalen Sehstärke zu. Da die weitere Bildverarbeitung auch für Netzhaut und Gehirn noch eine große Rolle spielt, kann allerdings nur eine grobe Abschätzung gegeben werden.

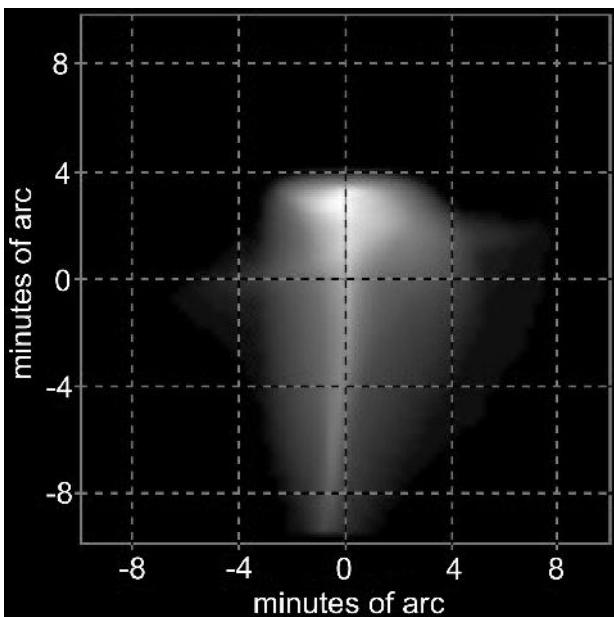


Abb. 1.27. Punktverwaschungsfunktion (PSF)

Effective Blur. Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der Wirkung der Aberrationen auf die Sehfähigkeit bietet der „Effective Blur“ (effektive Unschärfe). Er gibt an, durch welche Sphäre eine entsprechende Punktverwaschung entstehen würde, und ist damit ein weiteres einfaches Maß für die Stärke des Wellenfrontfehlers. Er ist besonders anschaulich, da er den Fehler mit der klassischen Refraktion vergleicht, deren Auswirkung bekannt ist.

1.6 Wellenfrontbasierte Optimierung der optischen Abbildung des menschlichen Auges mittels refraktiver Laserchirurgie

1.6.1 Einführung

Analyse der im menschlichen Auge vorhandenen Aberrationen. Man teilt die Aberrationen des menschlichen Auges in sog. Zernike-Polynome, um diese vereinfacht darstellen zu können. Es wird zwischen Aberrationen höherer und niederer Ordnung unterschieden. Die einzelnen Zernike-Koeffizienten, multipliziert mit den entsprechenden Zernike-Polynomen, werden addiert und bilden so die Summe der Aberration des einzelnen Auges. In Abb. 1.28 werden die Polynome der 0.–5. Ordnung graphisch dargestellt. Gezeigt und veranschaulicht werden die Abbildungsfehler mit einem Aberrometer.

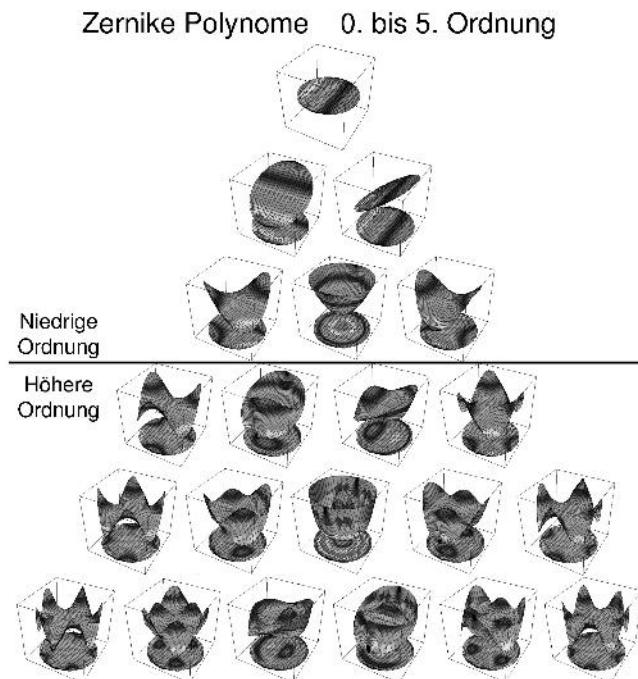


Abb. 1.28. Darstellung der Zernike-Polynome

Anwendungsweise eines Aberrometers. Das Aberrometer dient besonders der Messung von Aberrationen höherer Ordnung des menschlichen Auges, die oft neben Aberrationen niederer Ordnung wie Defokus und Astigmatismus ebenfalls die Qualität eines Bildes wesentlich beeinflussen können. Diese Abbildungsfehler haben eine Wellenfrontdeformation zur Folge, die graphisch

Wie wirken sich Aberrationen auf die Sehschärfe, den Visum aus?

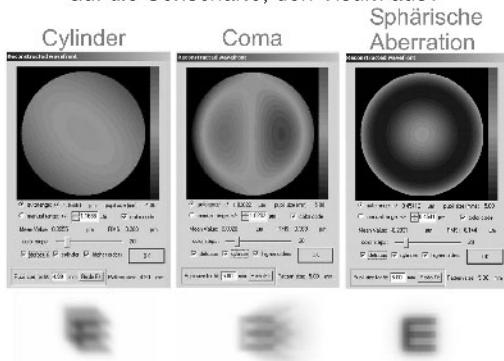


Abb. 1.29. Wirkung der Aberrationen auf die Sehschärfe, den Visus

im Gerät dargestellt werden kann. Das Maß der Aberration wird für jeden Punkt über die gesamte Weite der Pupille festgestellt. Diese diagnostische Information kann an den Excimerlaser weitergegeben werden, der damit für jeden einzelnen Punkt der optischen Oberfläche ein entsprechendes Abtragsprofil für die Operation festlegt.

Die Zernike-Polynome verändern die retinale Sehschärfe in der Summe und wirken sich daher unterschiedlich stark auf die Sehschärfe aus. Wie Abb. 1.29 zeigt, wird das Sehzeichen zwar erkannt, erscheint aber deutlich verzerrt. Das bedeutet, dass ein Objekt je nach Art und Größe der Aberrationen deutlich in der Gestalt verändert werden kann.

Die Operationsmethode. Die Laser-in-situ-Keratomileusis (LASIK) ist das derzeit fortgeschrittenste Verfahren zur Korrektur von Fehlsichtigkeiten. In der Kombination aus mikrochirurgischer Schnitttechnik und Gewebeverdampfung durch den Excimerlaser werden besonders rasche und genaue Ergebnisse erreicht. Die Vorteile der LASIK sind ein großer Korrekturbereich, eine schnelle Regeneration der Sehschärfe, eine schmerzfreie Heilphase, sowie stabile Ergebnisse.

Nach Abdeckung der Lider und Betäubung durch Augentropfen wird zunächst eine dünne Hornhautlamelle (Flap) mit einem sog. Mikrokeratom geschnitten und angehoben. Danach wird das darunter liegende Korneagewebe mit dem Laser passend modelliert. Sobald der Flap wieder in das Bett zurückgelegt wird, saugt er sich in wenigen Minuten an und verbindet sich in einigen Tagen wieder fest mit der Unterlage.

Wirkungsweise eines Excimerlasers. Mit Hilfe extrem hoher Energie ultravioletten Lichts wird eine bestimmte Menge von Hornhautgewebe durch

Verdampfung abgetragen und somit die Krümmung der Corneaoberfläche verändert.

Der Excimerlaser benutzt ein Fluorid-Argon-Gasgemisch in einer verspiegelten Röhre, um ultraviolette Lichtstrahlung zu erzeugen. Dieser Lichtstrahl extrem hoher Energie hat die Fähigkeit, Molekülverbindungen aufzubrechen, Gewebezellen zu verdampfen und mikroskopisch dünne Schichten abzutragen, ohne unmittelbar benachbarte Zellen zu beeinträchtigen. Hierdurch ist es also möglich, eine beliebig große und bis zu 1/1000 mm genaue Änderung der Hornhautoberfläche zu erreichen.

Konventionelle und wellenfrontgesteuerte LASIK im Vergleich. Vor jeder refraktiv-chirurgischen Korrektur erfolgt zunächst eine intensive Beurteilung der Augen mit einer Vielzahl von Spezialuntersuchungen. Der Untersucher nimmt eine subjektive Refraktionsbestimmung vor, um die bestmögliche Sehleistung des Patienten ermitteln zu können. Des weiteren werden noch folgende Messungen herangezogen: eine objektive Refraktion (meist bei Zykloplegie), die Refraktion des Aberrometers (bei genau definiertem Pupillendurchmesser), sowie eine Topographie der Korneaoberfläche und die zentrale Korneadicke. Diese Ergebnisse werden in einen präzisen Operationsplan umgesetzt und der Termin für den Eingriff nach einem ausführlichen Gespräch festgelegt.

Die Korrektur des Auges kann auf zwei unterschiedliche Abtragungsarten des Excimerlasers erfolgen. Man bezieht sich bei der konventionellen LASIK auf die subjektive Refraktionsbestimmung und richtet sich nach genauen Nomogrammen des Laserherstellers. Das Endrefraktionsziel kann der Operateur bei der konventionellen LASIK mit dem Patienten zusammen festlegen. Dies kann beispielsweise sinnvoll sein, um einem presbyopen Patienten das Sehen im Nahbereich zu erleichtern.

Die wellenfrontgesteuerte LASIK erfolgt nach Messungen mit dem Aberrometer. Ziel der wellenfrontgesteuerten LASIK ist die bestmögliche Fernkorrektur des Patienten. Mit Hilfe des Aberrometers kann die Refraktion über die gesamte Weite der Pupille ortsauflöst punktuell vermessen werden. Dadurch wird die Höhe der Aberrationen des Auges ermittelt. Diese diagnostischen Informationen gehen in das Abtragungsprofil des Excimerlasers ein, sodass die optische Oberfläche präzise optimiert werden kann.

Sind nur geringfügige Aberrationen höherer Ordnung zu messen, wird für den Patienten kein wesentlicher Vorteil durch die wellenfrontgesteuerte LASIK zu erreichen sein. In diesem Fall wird in der Regel die konventionelle LASIK Anwendung finden.

1.6.2 Die wellenfrontgesteuerte LASIK

Auswahl eines geeigneten Patienten

Ausschlusskriterien. Die wellenfrontgesteuerte LASIK ist ein neues operatives Verfahren in der refraktiven Chirurgie, welches noch nicht bei jedem Patienten Anwendung findet. Da man noch nicht aus einem umfangreichen Erfahrungsschatz schöpfen kann, wird diese Methode nur im Bereich niederer Fehlsichtigkeiten, insbesondere niederer Myopie verwendet. Die retinale Sehschärfe des Auges sollte mindestens 100% betragen und durch keine limitierenden Faktoren eingeschränkt werden. Daher sollte der Patient mit dem bestkorrigierenden Brillenglas eine Sehleistung von mindestens 100% (entspricht einem Visus von 20/20) aufweisen.

Weitere Voraussetzungen bei der Patientenauswahl sind ein gesundes Auge, Transparenz der optischen Medien, kein erhöhter Augeninnendruck, sowie keine anatomischen Besonderheiten.

Ebenfalls sind folgende Auffälligkeiten wie Autoimmunkrankheiten, degenerative Veränderungen am Auge, Diabetes mellitus, und hormonelle Störungen auszuschließen. Allergische Reaktionen auf postoperative Medikationen sind abzuklären.

Messungen. Ein Aberrometer wird benötigt, um niedere sowie höhere Aberrationen des menschlichen Auges punktuell über den gesamten Bereich der Pupille zu vermessen. Auf dem Monitor erscheint graphisch die Deformation einer ebenen Wellenfront, des vermessenen Auges. Die Durchführung einer wellenfrontgesteuerten LASIK benötigt deutlich mehr Messungen als bei konventioneller LASIK, da die OP-Planung hauptsächlich auf den Daten des Aberrometers beruht. Die konventionelle OP-Planung zieht subjektive sowie objektive Refraktionswerte heran. Das Flussdiagramm in Abb. 1.30 soll den Ablauf kurz veranschaulichen.

Es erfolgen mehrere Messungen pro Auge, die miteinander durch den Untersucher verglichen werden müssen. Liegen mindestens 3 Messungen in den

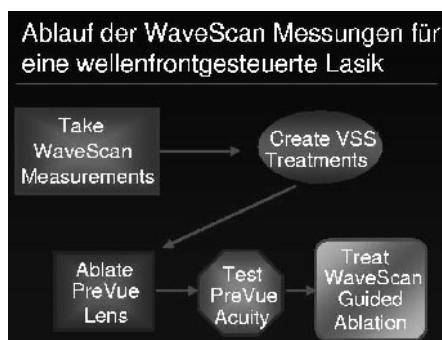


Abb. 1.30. Ablauf der WaveScan-Messungen für eine wellenfrontgesteuerte LASIK

vorgegebenen Clustern, kann eine Auswahl erfolgen. Die Daten der Aberrationen des zu operierenden Auges werden unter Berücksichtigung eines sog. Variable Spot Scanning (VSS) berechnet und ein Datenexport erstellt. Die Daten werden über eine Diskette in den Laser eingegeben. Die Ablation wird in ein PMMA-Plättchen übertragen, aus der die sog. PreVueTM-Linse entsteht. Ohne eine Behandlung des Auges kann so die Wirkung einer veränderten optischen Oberfläche getestet werden.

Der Patient kann durch diese „Kunststoff-Linse“ seine Sehleistung testen. Wird durch die PreVueTM-Linse eine deutlich bessere Sehleistung erreicht, als mit dem bestkorrigierenden Brillenglas, erstellt der Untersucher bzw. der Operateur eine wellenfrontgesteuerte Operationsplanung.

Die Vorteile dieser zunächst sehr aufwendig erscheinenden Methode werden in Kap. 1.6.3 beschrieben.

Patientenzahlen und -mittelwerte

Die folgenden Daten und Graphiken entstammen einer an der Augen-Laser-Klinik Lohr (Klinikleitung: Dr. med. M. Armbrust) durchgeführten Studie. Es wird das VISX-S3-WaveScan-Wellenfrontsystem für die LASIK-Operationen verwendet (Abb. 1.31).

Die ersten Ergebnisse werden nachfolgend präsentiert und bilden die Grundlagen der in Tabelle 1.3 dargestellten Mittelwerte.

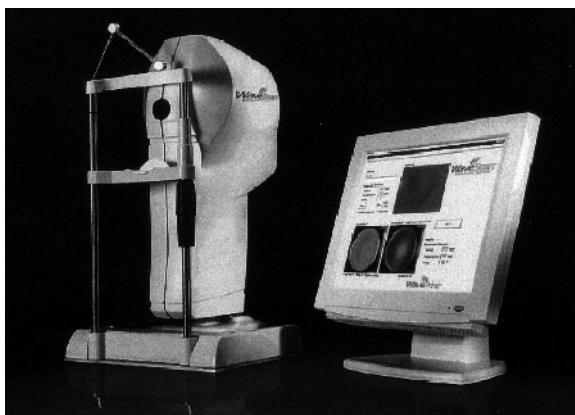


Abb. 1.31. WaveScan, 20/10 Perfect Vision

Tabelle 1.3. Patientenzahlen und -mittelwerte

Prä OP	Wellengesteuerte LASIK (dpt, n = 99)	Konventionelle LASIK (dpt, n = 668)
SR*-Sph.-Äquivalent	$-3,53 \pm 1,50$ (-6,00 bis -0,88)	$-3,71 \pm 1,41$ (-6,00 bis -0,82)
SR*-Sph.	$-3,14 \pm 1,41$ (-6,00 bis -1,00)	$-3,26 \pm 1,48$ (-6,00 bis -0,75)
SR*-Cyl.	$-0,78 \pm 0,61$ (-2,50 bis plan)	$-0,91 \pm 0,92$ (-3,00 bis plan)

* SR: Subjektive Refraktion

1.6.3 Erste klinische Ergebnisse der wellenfrontgesteuerten LASIK verglichen mit Daten der konventionellen LASIK-Methode

Im Rahmen der Studie waren die Fallzahlen an operierten Augen der wellenfrontgesteuerten LASIK geringer und auf maximal 100 Augen begrenzt. Die Ergebnisse der konventionellen LASIK dienen dem Vergleich und fanden innerhalb des letzten Jahres statt.

Vergleich der unkorrigierten Sehleistung 3 Monate postoperativ. Vergleicht man beide Operationsmethoden, stellt man mit der wellenfrontgesteuerten LASIK eine deutlich bessere Sehleistung fest (Abb. 1.32). 19% der

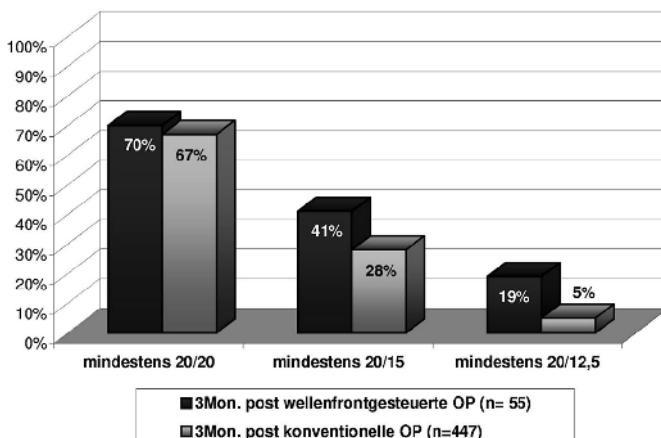


Abb. 1.32. Vergleich der unkorrigierten Sehleistung 3 Monate post OP (UCVA – uncorrected visual acuity)

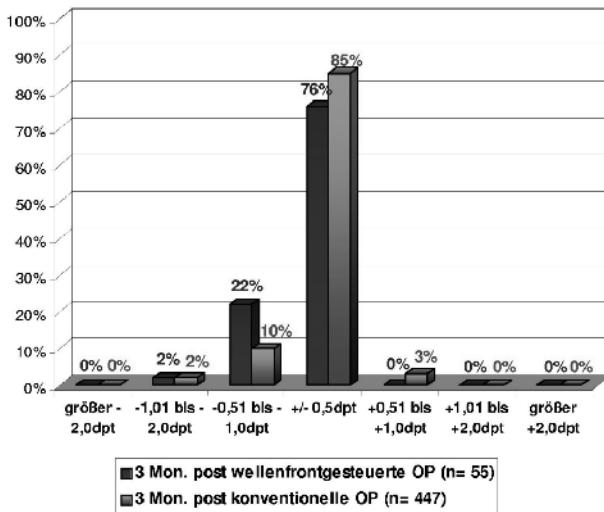


Abb. 1.33. Zielgenauigkeit

operierten Augen besitzen eine Sehleistung von 160% oder besser (20/12,5), bei der konventionellen hingegen nur 5%. Insgesamt kann durch die wellenfrontgesteuerte LASIK eine Steigerung um 3% bei 100% (20/20) Sehleistung postoperativ verzeichnet werden.

Vergleich der Zielgenauigkeit des Excimerlasers: Augen innerhalb der angestrebten Korrektur. In Abb. 1.33 ist die Zielgenauigkeit des Excimerlasers im direkten Vergleich wellenfrontgesteuert zu konventionell dargestellt. Die Augen liegen nach 3 Monaten bei der wellenfrontgesteuerten zu 76% und bei der konventionellen LASIK zu 85% in dem vom Operateur angestrebten Korrekturbereich. Aus der Abbildung ist bei der wellenfrontgesteuerten LASIK eine Unterkorrektur ersichtlich. Bei der konventionellen OP sind sowohl leichte Unter- wie Überkorrekturen aufgetreten.

Vergleich der bestkorrigierten Sehleistung 3 Monate postoperativ. Vergleicht man die bestkorrigierte Sehleistung 3 Monate postoperativ, so lässt sich bei einer wellenfrontgesteuerten LASIK nur bei 4% der Augen ein Verlust an Zeilen nachweisen, bei der konventionellen LASIK sind es hingegen 17%, die mindestens eine Linie schlechter sehen (Abb. 1.34). Bei 63% der wellenfrontgesteuert operierten Augen wurde mindestens eine Linie dazu gewonnen – ein ausgezeichnetes Ergebnis; dies war nur bei 38% der konventionell operierten Augen der Fall.

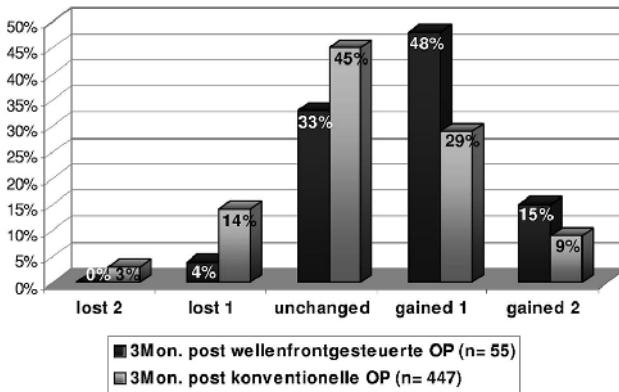


Abb. 1.34. Vergleich der bestmöglichen Sehleistung prae OP mit der bestkorrigierten Sehleistung 3 Monate post OP

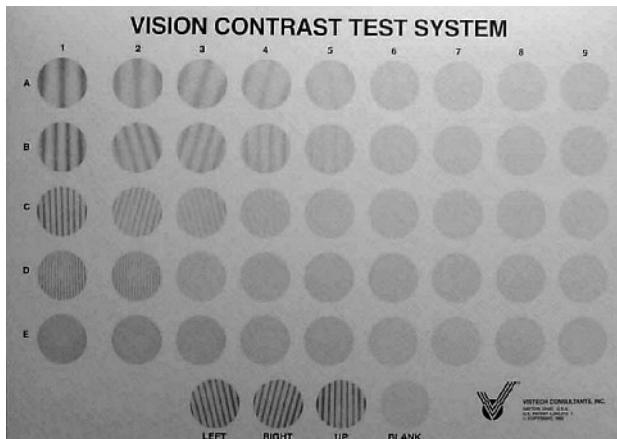


Abb. 1.35. Kontrastempfindlichkeitstest

Kontrastempfindlichkeit (Vistech 6500). Die Messung der Kontrastempfindlichkeit kann mit Gittern (Sinusgitter oder Rechteckgitter) sowie Optotypen (Buchstaben, Landolt-Ringe, ...) durchgeführt werden.

Die in dieser Studie verwendeten Vistech-Tafeln bestehen aus 5 Reihen mit jeweils 9 kreisrunden Feldern (Abb. 1.35). Diese Felder enthalten Gitter mit sinusförmiger LeuchtdichteVerteilung. Die Prüfentfernung beträgt 3 m. Die Messung erfolgt bei normaler Beleuchtung im Raum. Es ist auf eine gleichmäßige Ausleuchtung der Tafel zu achten. Der Kontrast nimmt auf der Vistech-Tafel von links nach rechts ab.

Die Ortsfrequenzen der Gitter sind in den 5 Reihen bei 3 m Prüfentfernung 1,5, 3, 6, 12, sowie 18 Perioden pro Grad. Der Patient benennt in diesen 5 Reihen jeweils das letzte erkennbare kreisrunde Feld mit der dazugehörigen Ori-

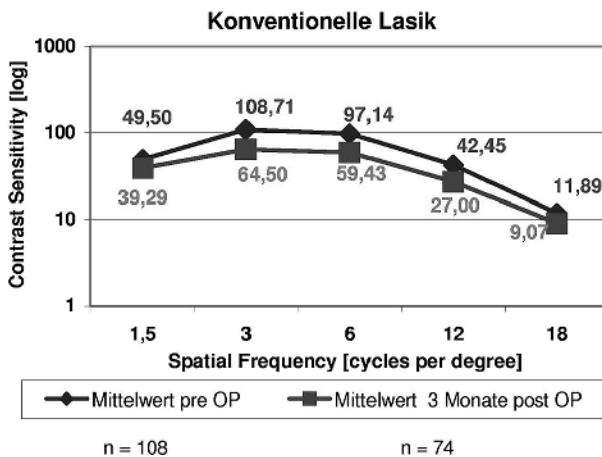


Abb. 1.36. Auswertung bei konventioneller LASIK

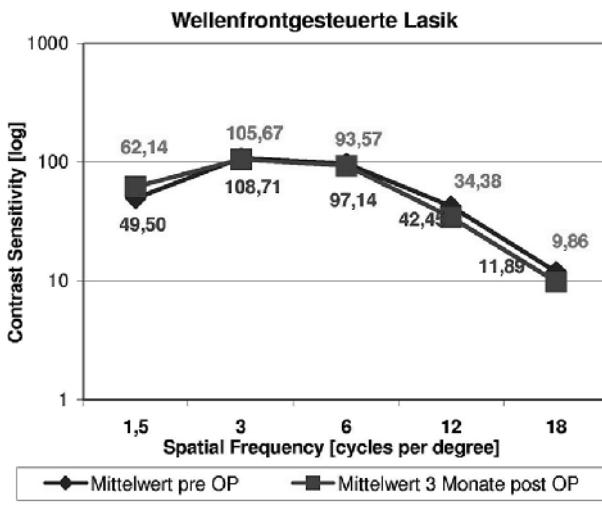


Abb. 1.27 Auswirkungen bei wellenfrontgesteuerten LASIK

entierung. Die Orientierung der Gitter kann *oben*, *rechts*, *links* oder *blank* sein. Die Darstellung der gemessenen Kontrastempfindlichkeit erfolgt in graphischer Form in einem vom Hersteller vorgegebenen Auswertungsschema.

Der Test wurde im Rahmen der Voruntersuchung mit der bestmöglichen Fernkorrektur, sowie 1 und 3 Monate nach der Behandlung ohne Korrektur durchgeführt.

Den Referenzwert bilden die Untersuchungen bei konventioneller LASIK. Wie aus anderen Untersuchungen bekannt, verschlechtert sich die Kontrastempfindlichkeit grundsätzlich postoperativ um einen gewissen Betrag. Die

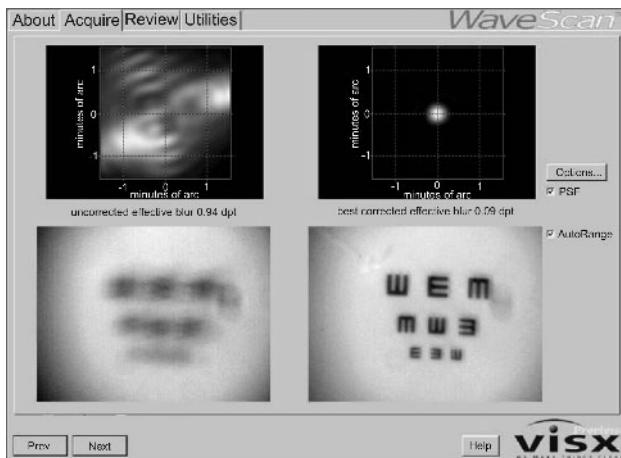


Abb. 1.38. Analyse ungestörter und gestörter Systeme mit Hilfe adaptiver Optik im WaveScan II

postoperativen Messungen wurden jeweils monokular und ohne jegliche Korrektion durchgeführt. Die Beleuchtungsstärke und die Raumbedingungen wurden standardisiert.

Bisher sind in der Literatur aus diesem Test gewonnene postoperative Ergebnisse der Kontrastempfindlichkeit nach wellenfrontgesteuerter Behandlung nicht bekannt. Wie in Abb. 1.37 zu erkennen, steigt die Kontrastempfindlichkeit 3 Monate postoperativ im Vergleich zu den Werten bei der konventionellen OP (Abb. 1.36). Diese Messungen wurden ebenfalls monokular und ohne jegliche Korrektur durchgeführt. Die Beleuchtungsstärke und die Raumbedingungen wurden auch bei diesen Untersuchungen standardisiert.

Die Kontrastempfindlichkeit ist nicht nur postoperativ objektiv besser, sondern äußert sich auch rein subjektiv in der Patientenzufriedenheit. Die Erkennbarkeit von feineren Strukturen steigt deutlich an. Dadurch sind feine Details für den Patienten besser zu erkennen. Das gestiegene Auflösungsvermögen äußert sich auch in einer besseren Sehschärfe postoperativ.

1.6.4 Ausblick

Im WaveScan II (20/10 Perfect Vision) kann durch eine dynamische Kompensation mit Hilfe eines aktiven Spiegels die bestmögliche Sehschärfe für den Patienten ermittelt werden.

Nach einer Messung des Wellenfrontfehlers kann dieser durch einen aktiven Spiegel minimiert werden und dem Patienten so seine optimale Sehschärfe präsentiert werden (Abb. 1.38).

Literatur

1. Bille J, Büchler-Costa J, Müller F (2003) Optical quality of the human eye: The quest for perfect vision, pp. 26-46. In: Bille J, Harner C, Lösel F (eds) Aberration-free refractive Surgery, Springer, Berlin Heidelberg New York Hong Kong London Milan Paris Tokyo
2. Barlow HW, Mollon JD (eds) (1982) The senses. Cambridge University Press, Cambridge
3. Charman WN (ed) (1991) Vision and Visual Dysfunction, Vol 1 Visual Optics and Instruments, Macmillan Press, Basingstoke London
4. Corbett MC, Rosen ES, O'Brart D (ed) (1999) Corneal topography: Principles and applications. BMJ Books, London
5. Le Grand Y, El Hage SG (1980) Physiological Optics, Springer, Berlin Heidelberg New York
6. Grehn F, Leydhecker W (1995) Augenheilkunde, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
7. Grüsler O-J, Grüsler-Cornehls U (1989) Gesichtssinn und Okulomotorik, pp. 278-315. In: Schmidt R, Thews G (Hrsg) Physiologie des Menschen, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
8. Holladay JT (1997) Corneal topography using the Holladay diagnostic summary. *J Cataract Refract Surg* 23:209-221
9. Kawara T (1979) Corneal topography using Moiré contour fringes. *Applied Optics* 18:3675-3678
10. Klein SA, Mandell RB (1995) Shape and refractive powers in corneal topography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2096-2109
11. Liang J, Grimm B, Götz S, Bille JF (1994) Objective measurement of wave aberrations of the human eye with the use of a Hartmann-Shack wave-front sensor. *J Opt Soc Am A* 11:1949-1957
12. Liang J, Williams DR (1997) Aberrations and retinal image quality of the normal human eye. *J Opt Soc Am A* 14:2873
13. Seiler T, Mrochen M (2003) Wellenfrontanalyse (Aberrometrie) in der physiologischen Optik. In: Kampik A, Grehn F (Hrsg) Augenärzliche Diagnostik, Thieme, Stuttgart
14. Walsh G, Charman WH, Howland HC (1984) Objective technique for the detection of monochromatic aberrations of the human eye. *J Opt Soc Am A* 1:987
15. Warnick JW, et all (1988) Corneal topography using computer analyzed raster-stereographic images, *Applied Optics*, 27:1135-1140
16. Williams DR (1985) Aliasing in human foveal vision, *Vision Res*, 25:195
17. Bende T, Jean B (2003) Topometrie und Keratometrie – aktueller Stand der Technik. In: Kampik A, Grehn F (Hrsg) Augenärzliche Diagnostik, Georg Thiems Verlag, Stuttgart

2 Optische Komponenten

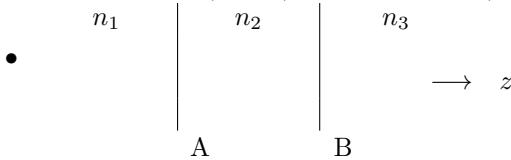
M. Niemz

2.1 Eigenschaften von optischen Substraten

Entsprechend den sehr verschiedenen ausfallenden Anforderungen für optische Systeme gibt es auch eine Vielzahl optischer Materialien (Substrate). Die beiden wichtigsten optischen Parameter eines Substrats sind sein Absorptionskoeffizient α und sein Brechungsindex n . Beide Parameter sind stark frequenzabhängig. Die Transmission eines Substrats bestimmt sich aus α und n , wie das folgende Beispiel zeigt.

Annahmen:

- 3 Medien (n_1, n_2, n_3)
- Grenzfläche A ($1 \rightarrow 2$), Grenzfläche B ($2 \rightarrow 3$)



$$\text{Transmission} \quad T = t_1 t_2 \exp(-\alpha z) \quad (2.1)$$

$$t_A = 1 - r_A \quad (2.2)$$

$$t_B = 1 - r_B \quad (2.3)$$

$$\text{Fresnel-Formeln} \quad r_A = \left(\frac{n_2 - n_1}{n_1 + n_2} \right)^2 \quad (2.4)$$

$$r_B = \left(\frac{n_3 - n_2}{n_2 + n_3} \right)^2. \quad (2.5)$$

Im Spezialfall $n_1 = n_3 = 1$ (Vakuum) folgt

$$r_A = \left(\frac{n_2 - 1}{n_2 + 1} \right)^2. \quad (2.6)$$

Der Absorptionskoeffizient α ist prinzipiell bei jedem Substrat vorgegeben. Je nach Wellenlänge muss folglich ein Substrat mit einem geeigneten α ausgewählt werden. Die Parameter t und r hingegen sind zwar auch zunächst durch das Substrat vorgegeben – nämlich durch seinen Brechungsindex n –,

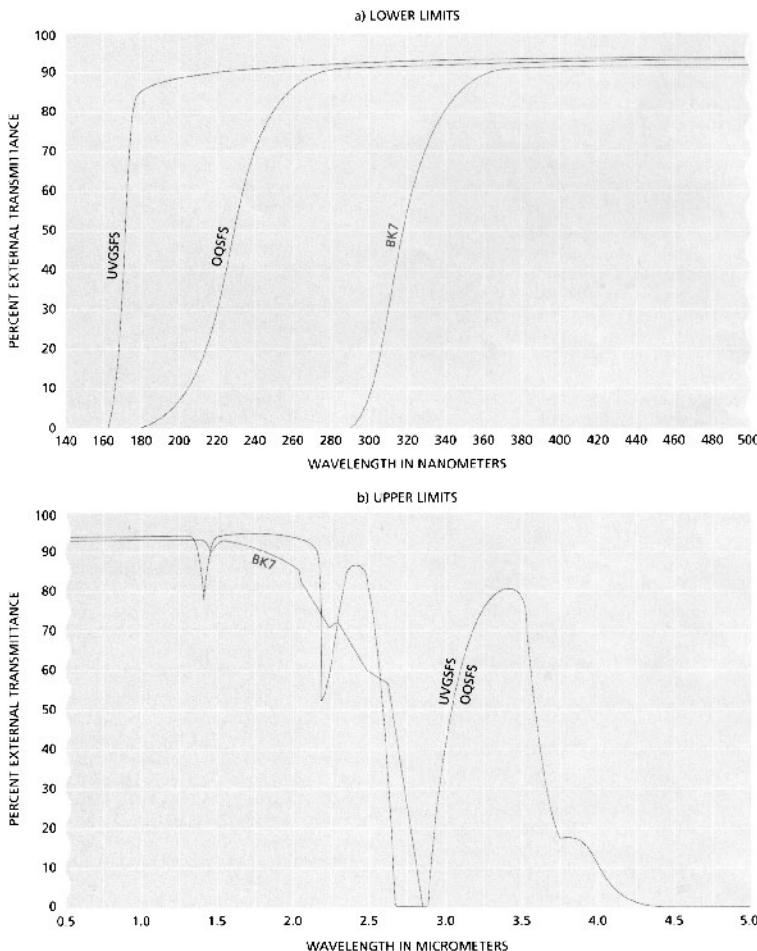


Abb. 2.1. Transmission von BK-7, OQSFs und UVGSFS. Entnommen aus Melles-Griot-Katalog (1995)

sie können aber durch geeignete Beschichtungen (Coatings) gezielt verändert werden (Kap. 2.3).

Abbildung 2.1 zeigt den Verlauf der Transmission von BK7-Glas, Quarzglas (optical quality synthetic fused silica, OQSFs) und UV-Quarzglas (UV-grade synthetic fused silica, UVGSFS) im UV-, VIS- und nahen IR-Bereich. Für Wellenlängen größer als $2,5 \mu\text{m}$ werden i. Allg. Optiken aus Zinkselenid oder Kalziumfluorid verwendet. Will man gezielt bestimmte Wellenlängenbereiche unterdrücken, so kommen Glasfilter mit spezifischen Absorptionsbanden zum Einsatz.

Neben den optischen Parametern werden oft auch Anforderungen an die mechanischen oder thermischen Parameter eines Substrats gestellt. So soll

Tabelle 2.1. Elastizitätsmodul und Wärmeausdehnung einiger wichtiger Substrate

	Elastizitätsmodul (N/mm ²)	Wärmeausdehnung (°C ⁻¹)
BK7-Glas	$8,1 \times 10^4$	$7,1 \times 10^{-6}$
Quarzglas	$6,6 \times 10^4$	$5,5 \times 10^{-7}$
Saphir	$3,7 \times 10^5$	$7,7 \times 10^{-6}$
Zerodur	$9,1 \times 10^4$	$5,8 \times 10^{-8}$

es z.B. besonders robust oder wärmestabil sein. Hier spielen dann solche Größen wie Elastizitätsmodul oder Wärmeausdehnung eine wichtige Rolle. Tabelle 2.1 fasst die Daten einiger wichtiger Substrate zusammen.

Hieraus kann gefolgert werden, dass Saphir ein mechanisch sehr robustes und Zerodur ein thermisch sehr robustes Substrat ist. BK7-Glas ist am preisgünstigsten herzustellen. Quarzglas (fused silica) erfüllt höhere optische Ansprüche. Es kann zudem für den UV-Bereich transparent gemacht werden (UVGSFS).

2.2 Brechende Medien

In der Optik gibt es eine Vielzahl von Licht brechenden Elementen. Dies sind u.a. Linsen, Prismen und Lichtfasern.

2.2.1 Linsen

Für den optischen Einsatz einer Linse sind insbesondere ihre Brennweite f und ihr Durchmesser $d = 2w$ maßgeblich. Statt einer dieser beiden Größen wird eine Linse in der Optik auch oft durch eine daraus ableitbare Größe charakterisiert, nämlich entweder durch ihre Brechkraft (f-number) oder ihre numerische Apertur (N.A.). Diese lassen sich schreiben als

$$\text{Brechkraft } f_{\#} = f/2w, \quad (2.7)$$

$$\text{Numerische Apertur } \text{NA} = \sin \theta \simeq w/f. \quad (2.8)$$

$$\text{Hieraus folgt } f_{\#} = \frac{1}{2 \text{NA}}. \quad (2.9)$$

Bei Angabe eines der Paare $(f_{\#}, f)$, $(f_{\#}, w)$, $(\text{N.A.}, f)$ oder $(\text{N.A.}, w)$ sind folglich die Linsenparameter bei einer Wellenlänge vollständig bestimmt. In einigen Anwendungen (Mikroskop, Lupe) wird manchmal auch alternativ die Vergrößerung angegeben. Diese ergibt sich beim Mikroskopobjektiv zu $16 \text{ cm}/f$ (wegen der Tubuslänge von 16 cm) und bei der Lupe zu $25 \text{ cm}/f$ (wegen des normalen Leseabstands von 25 cm).

Man unterscheidet verschiedene Linsenformen (bikonvex, plankonvex, bikonkav, plankonkav, best-form) und Linsentypen (Singlett, Achromat) [1].

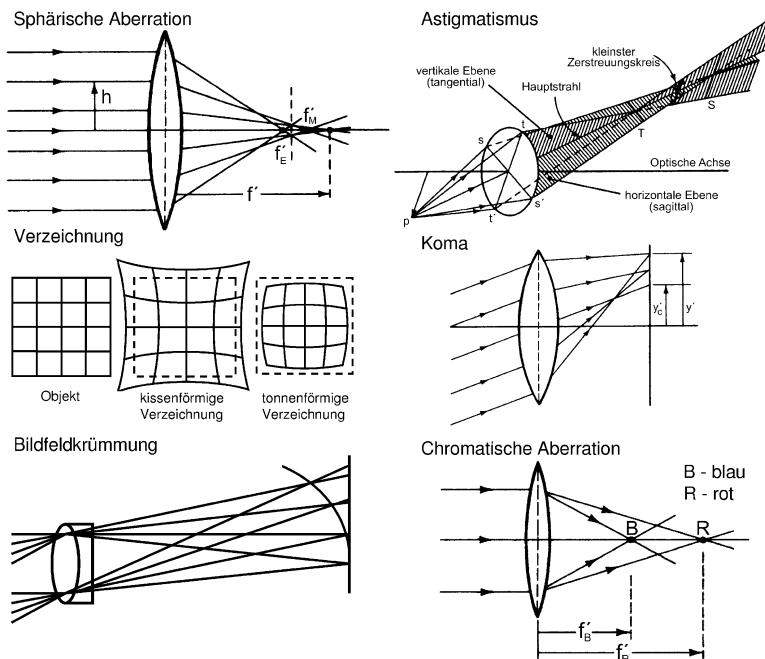


Abb. 2.2. Optische Abbildungsfehler (Aberrationen). Entnommen aus Melles-Griot-Katalog (1995)

Je nach Anwendung (z.B. 1:1-Abbildung, Vergrößerung, Verkleinerung) kommen unterschiedliche Linsenformen zum Einsatz, da hierbei spezifische Abbildungsfehler (Aberrationen) minimiert werden können. Sollen gleichzeitig mehrere Wellenlängen geführt werden, so werden mehrere Einzellinsen aus verschiedenen Substraten zu einem Achromaten zusammengesetzt, da man hier über die wellenlängenabhängigen Brechungsindizes zusätzliche Freiheitsgrade hat. Abbildung 2.2 fasst alle bekannten Abbildungsfehler zusammen.

2.2.2 Prismen

Es gibt verschiedene Prismenformen je nach spezifischer Anwendung. So kann man z.B. mit Prismen ein Bild umkehren (90° -Prismen) oder drehen (Dove-Prismen). Darüber hinaus wird in einigen Anwendungen die Dispersion von Prismen ausgenutzt (Dispersionsprismen). Setzt man zwei Prismen zu einem Bauteil zusammen, so kann man diesen als Strahlteiler oder auch als Polarisator (Brewster-Prisma) verwenden.

2.2.3 Lichtfasern

Lichtfasern werden in der Optik vorwiegend aus zwei Gründen eingesetzt. Zum einen ermöglichen sie eine sehr flexible Strahlführung über kurze oder

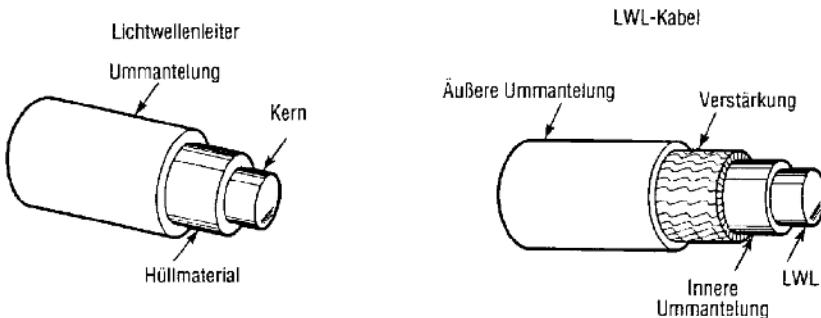


Abb. 2.3. Lichtwellenleiter und Wellenleiterkabel

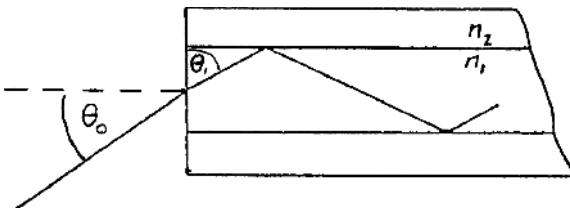


Abb. 2.4. Geometrie zur Totalreflexion

auch sehr lange Strecken, zum anderen kann man mit ihnen bei entsprechender Faserlänge sehr starke Dispersionseffekte induzieren. Abbildung 2.3 zeigt den typischen Aufbau eines Lichtwellenleiters und eines Wellenleiterkabels (Lichtfaser).

Der Wellenleiter besteht aus einem Kern mit Brechungsindex n_1 und einem Hüllmaterial mit Brechungsindex n_2 , wobei $n_2 < n_1$. Nur dann kann nämlich eine Lichtwelle in dem Wellenleiter über den Mechanismus der Totalreflexion geführt werden. Die Winkelakzeptanz einer Lichtfaser ist gegeben durch ihre numerische Apertur (NA). Nach Abb. 2.4 gilt

$$\text{NA} = \sin \theta_0 = n_1 \sin \theta_1 = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}, \quad (2.10)$$

$$\text{da } n_1 \sin(90^\circ - \theta_1) = n_2 \quad (2.11)$$

$$\rightarrow \cos \theta_1 = n_2/n_1 \quad (2.12)$$

$$\rightarrow \sin \theta_1 = \sqrt{1 - \cos^2 \theta_1} = \sqrt{1 - n_2^2/n_1^2}. \quad (2.13)$$

Man unterscheidet zwischen einem Stufenindexprofil und einem Gradientenindexprofil, je nachdem ob die Änderung des Brechungsindex in der Faser sprungartig oder kontinuierlich erfolgt. Ferner sind sog. Multimode-Lichtfasern oder aber Singlemode-Lichtfasern erhältlich. Letztere weisen einen Kerndurchmesser in der Größenordnung der Wellenlänge auf, sodass in diesen Lichtfasern nur der Grundmode übertragen werden kann.

2.3 Beschichtungen, Spiegel und Filter

Beschichtungen spielen immer dann eine wichtige Rolle, wenn man entweder einen sehr hohen (oder auch niedrigen) Reflexionskoeffizienten an einer Grenzfläche erhalten will. Man unterscheidet metallische und dielektrische Beschichtungen. Metallische Beschichtungen sind einfach herzustellen (preiswert) und weisen eine mäßige Wellenlängenabhängigkeit auf. Dielektrische Beschichtungen sind aufwendiger in der Herstellung (teuer) und weisen eine i. Allg. sehr starke Wellenlängenabhängigkeit auf. Die Anwendungen von Beschichtungen umfassen Spiegel, HR- und AR-Coatings (hochreflektierend bzw. antireflex), Interferenzfilter und Strahlteiler.

2.3.1 Metallische Beschichtungen

In Abb. 2.5 ist das Reflexionsvermögen von einigen typischen metallischen Beschichtungen dargestellt. Einfache Metallspiegel erhält man bereits mit einer Aluminiumschicht. Zur Erhöhung der Lebensdauer werden diese Spiegel oft mit einer dünnen Schutzschicht aus Quarz versehen. Silber weist einen höheren Reflexionskoeffizienten auf, oxidiert aber sehr leicht. Eine gute Alternative für IR-Optiken stellt die Goldbeschichtung dar.

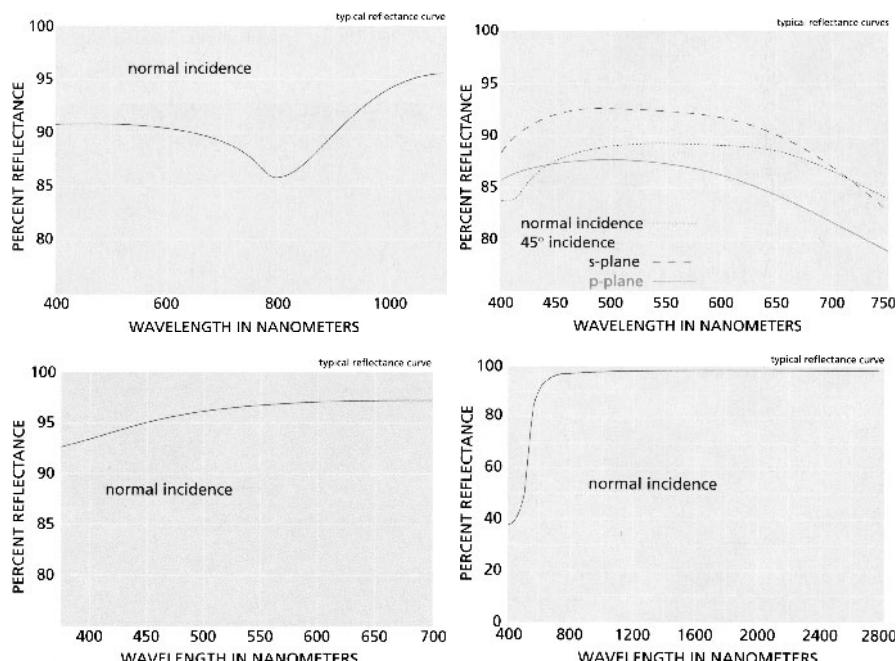


Abb. 2.5. Reflexionsvermögen von metallischen Beschichtungen. Entnommen aus Melles-Griot-Katalog (1995)

2.3.2 Dielektrische Beschichtungen

Bei dielektrischen Beschichtungen werden eine oder mehrere Schichten mit verschiedenen Brechungsindizes auf ein Substrat aufgedampft. Durch ein gezieltes Abstimmen der Brechungsindizes untereinander und mit dem Brechungsindex des Substrats sowie eine bestimmte Schichtendicke kann man einfallende und reflektierte Lichtstrahlen zur konstruktiven oder destruktiven Interferenz bringen. Im ersten Fall wird der Reflexionskoeffizient des Substrats stark überhöht, im zweiten Fall dagegen stark abgeschwächt. Auf diese Weise lassen sich sowohl hochreflektierende Spiegel (sog. HR-Spiegel) als auch Optiken mit einer sog. Antireflexbeschichtung (AR) herstellen.

Antireflexschichten spielen eine wichtige Rolle in Laserresonatoren, da es hier auf extrem geringe Leistungsverluste ankommt. Nun haben wir aber in Kap. 2.1 gesehen, dass jede Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes eine Reflexion verursacht. Diese kann zwar für die Polarisationsrichtung parallel zur Einfallsebene minimiert werden (Abb. 2.6), jedoch muss man hierzu das Bauteil unter einem bestimmten Winkel (den sog. Brewster-Winkel) aufstellen. Die daraus resultierende Brechung ist nicht immer erwünscht, und man arbeitet auch nicht immer mit polarisiertem Licht. Abbildung 2.7 verdeutlicht, wie man mit einer dielektrischen Schicht (Brechungsindex n) der Dicke t ein AR-Coating auf einem Glassubstrat ($n = 1,52$) auftragen kann.

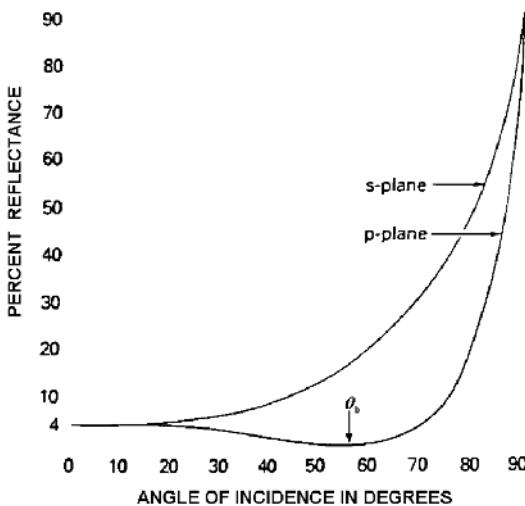


Abb. 2.6. Reflexion als Funktion des Einfallwinkels. Entnommen aus Melles-Griot-Katalog (1995)

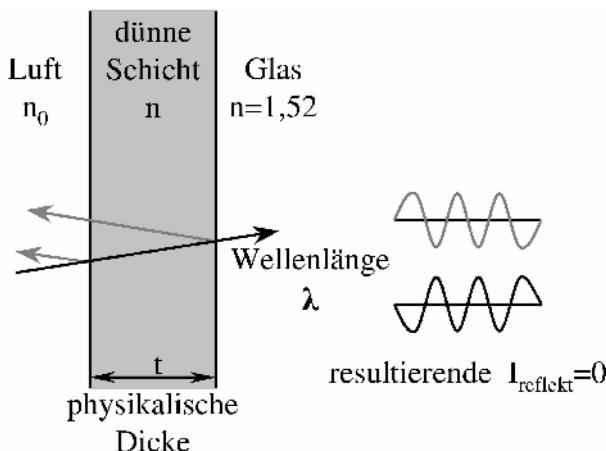


Abb. 2.7. Prinzip des AR-Coating. Entnommen aus Melles-Griot-Katalog (1995)

2.4 Polarisationsempfindliche Optiken

Bei vielen optischen Anwendungen spielt die Polarisierbarkeit von Licht eine entscheidende Rolle [2]. Man unterscheidet zwischen linear polarisiertem und elliptisch polarisiertem Licht, je nachdem ob der elektrische Feldstärkevektor in einer konstanten Richtung schwingt oder ob sich die Richtung dieses Vektors um die Ausbreitungsachse des Lichts dreht. Sind die beiden Amplituden der Feldstärkekomponenten E_x und E_y gleich groß (z : Ausbreitungsachse des Lichts), so spricht man von zirkular polarisiertem Licht. Zwei besonders wichtige Bauelemente, welche die Polarisierbarkeit von Licht ausnutzen, sind unter den Namen *Pockel-Zelle* und *Faraday-Rotator* bekannt.

2.4.1 Polarisatoren

Bauelemente, die aus unpolarisiertem Licht polarisiertes Licht erzeugen können, nennt man *Polarisatoren*. Polarisatoren werden vorwiegend aus doppelbrechenden Substraten oder feinen optischen Gittern realisiert. In einigen Anwendungen werden auch polarisierende Prismen eingesetzt.

2.4.2 Verzögerungsplatten

Das Drehen der Polarisationsebene und die Umwandlung von linear polarisiertem in elliptisch polarisiertes Licht (und umgekehrt) wird von sog. *Verzögerungsplatten* bewerkstelligt. Hierbei handelt es sich um doppelbrechende Substrate, bei welchen die polarisationsabhängige Durchlaufzeit ausgenutzt wird. Man unterscheidet $\lambda/4$ - und $\lambda/2$ -Plättchen. Beim $\lambda/4$ -Plättchen wird die Phase des außerordentlichen Strahls um 90° gegenüber dem ordentlichen Strahl verschoben. Damit lässt sich linear polarisiertes Licht in elliptisch polarisiertes Licht umwandeln. Beim $\lambda/2$ -Plättchen wird die Phase des außerordentlichen Strahls um 180° gegenüber dem ordentlichen Strahl verschoben. Damit lässt sich die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht drehen.

2.4.3 Pockel-Zellen

Bei der *Pockel-Zelle* wird ein elektrooptischer Effekt ausgenutzt, um einen sehr schnellen optischen Schalter aufzubauen. Unter dem elektrooptischen Effekt versteht man die Tatsache, dass manche Substrate bei Anlegen eines externen elektrischen Feldes doppelbrechend werden. In der Literatur werden Pockel- und Kerr-Effekt unterschieden. Der Pockel-Effekt ist proportional zum extern anliegenden elektrischen Feld. Der Kerr-Effekt ist dagegen von dem Quadrat der elektrischen Feldstärke abhängig.

Es wird ferner zwischen dem longitudinalen und dem transversalen Pockel-Effekt unterschieden, je nachdem ob das elektrische Feld parallel oder senkrecht zum optischen Lichtweg anliegt (Abb. 2.8). Beim longitudinalen Pockel-Effekt gilt:

$$n_o - n_{ao} = n_o^3 r_{63} E = n_o^3 r_{63} \frac{U}{l} \quad \text{und} \quad (2.14)$$

$$\Delta\Phi = \frac{2\pi}{\lambda} l (n_o - n_{ao}) = \frac{2\pi}{\lambda} n_o^3 r_{63} U, \quad (2.15)$$

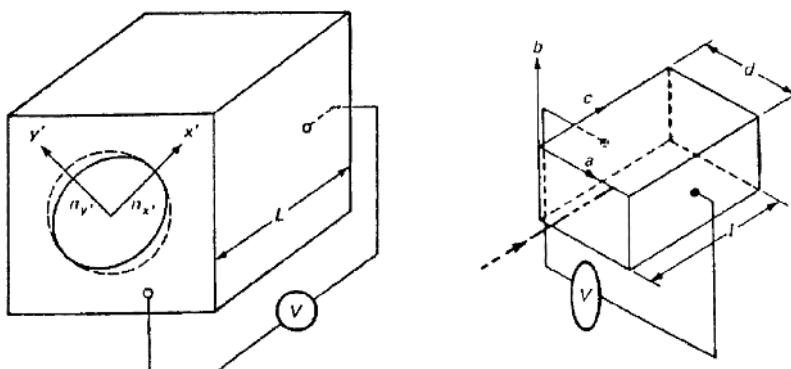


Abb. 2.8. Longitudinaler (links) und transversaler (rechts) Pockel-Effekt

wobei n_o , n_{ao} für den Brechungsindex für ordentlichen bzw. außerordentlichen Strahl steht, r_{63} und r_{22} für Komponenten des elektrooptischen Tensors, E für das elektrische Feld, U für elektrische Spannung, l für Kristallänge, d für Kristalldicke, $\Delta\Phi$ für den Phasenunterschied und λ für die Wellenlänge. Beim transversalen Pockel-Effekt gilt dagegen

$$n_o - n_{ao} = 2n_o^3 r_{22} E = 2n_o^3 r_{22} \frac{U}{d} \quad \text{und} \quad (2.16)$$

$$\Delta\Phi = \frac{2\pi}{\lambda} l(n_o - n_{ao}) = \frac{4\pi}{\lambda} \frac{l}{d} n_o^3 r_{22} U. \quad (2.17)$$

Da folglich beim transversalen Pockel-Effekt das Verhältnis von Kristallänge zu Kristalldicke eingeht, kann man bei geeigneter Wahl dieser Parameter die erforderliche Spannung U reduzieren.

2.4.4 Faraday-Rotatoren

Bei dem *Faraday-Rotator* wird ein magnetooptischer Effekt verwendet, um Einwegstrecken (Dioden) für polarisiertes Licht zu realisieren. Der magnetooptische Effekt besagt, dass manche Substrate unter Einfluss eines magnetischen Feldes doppelbrechend werden. Die Stärke des Effekts, d.h. der Drehwinkel α für die Polarisationsrichtung von linear polarisiertem Licht, ist von der Verdet-Konstante V abhängig:

$$\alpha = V l B, \quad (2.18)$$

wobei l die Länge des Rotators und B das angelegte Magnetfeld angeben.

2.5 Lichtmodulatoren

Wichtige Bausteine in der modernen Laserphysik bilden die Lichtmodulatoren. Mit diesen Modulatoren kann man einem Lichtstrahl ein bestimmtes zeitliches Profil aufzwängen. Sie spielen daher in der Nachrichtentechnik eine große Rolle. Modulatoren finden aber auch eine besondere Bedeutung bei der Kompression von Laserpulsen (Güteschaltung, Modenkopplung). Man unterscheidet zwischen *elektrooptischen Modulatoren* und *akustooptischen Modulatoren*, je nachdem ob der Modulationseffekt über ein elektrisches Feld oder eine stehende akustische Welle induziert wird. Im elektrischen Feld kann über die veränderbare Doppelbrechung die Intensität moduliert werden. Als Bauelement dient die bereits in Kap. 2.4 beschriebene Pockel-Zelle. Bei akustooptischen Modulatoren wird mit Hilfe einer Piezokeramik eine akustische Welle im Kristall generiert. Daraus resultiert ein extern modulierbares, gitterförmiges Profil für den Brechungsindex, wodurch der durchgehende Lichtstrahl gebeugt wird. Somit lässt sich die Transmission eines solchen Bauelements gezielt modulieren.

2.6 Optische Detektoren

In der Optik können je nach Anforderung verschiedene Detektoren zum Nachweis von Photonen eingesetzt werden [3].

2.6.1 Photodioden

Der einfachste Detektor ist – abgesehen von der Photoplatte – die *Photodiode*. Sie besteht aus einem Halbleiterchip, an welchem sich bei Absorption von Photonen ein elektrisches Stromsignal abgreifen lässt. Der Chip ist meistens auf Silizium- oder Germanium-Basis aufgebaut und weist einen oder mehrere pn-Übergänge auf. In Abb. 2.9 ist der typische Aufbau einer Photodiode schematisch dargestellt.

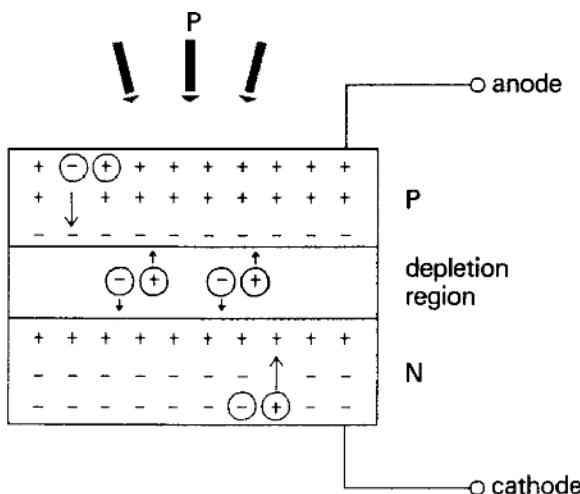


Abb. 2.9. Aufbau einer Photodiode

2.6.2 Charge-Coupled Devices (CCD)

Zum Abtasten eines zweidimensionalen Strahlprofils verwendet man die sog. *charge-coupled devices (CCD)*. Hierbei handelt es sich um ein Array von einzelnen MOS-Kapazitäten, welches durch ein elektrisches Verschieben der durch Licht induzierten, freien Ladungsträger in extrem kurzer Zeit ausgeleren werden kann. Der eigentliche Trick bei den CCD-Chips liegt in der angewandten Auslesetechnik. Durch geeignete extern gesteuerte, elektrische Potentiale lassen sich die Ladungsträger verschieben und über ein Multiplexverfahren detektieren.

2.6.3 Photomultiplier

Im Fall von sehr geringen Lichtintensitäten kommt meistens ein *Photomultiplier* zum Einsatz. Diese Bauelemente bestehen in der Regel aus einer Photokathode, mehreren Beschleunigerdynoden und einer Anode zum Abgreifen des Signals. Dabei werden zunächst durch Lichtabsorption an der Photokathode freie Photoelektronen erzeugt, welche anschließend in dem sehr hohen elektrischen Feld der Dynodenkaskade beschleunigt werden. Hierbei kommt es zu einem multiplizierenden Effekt der Primärelektronen, sodass sich mit dem Photomultiplier auch einzelne Photonen nachweisen lassen. Durch die Integration von geeigneten Gitterstrukturen lässt sich die hohe Zeitauflösung eines Photomultipliers mit einer oft hinreichenden Ortsauflösung kombinieren. In Abb. 2.10 ist die Funktionsweise eines solchen positionsempfindlichen Photomultipliers dargestellt.

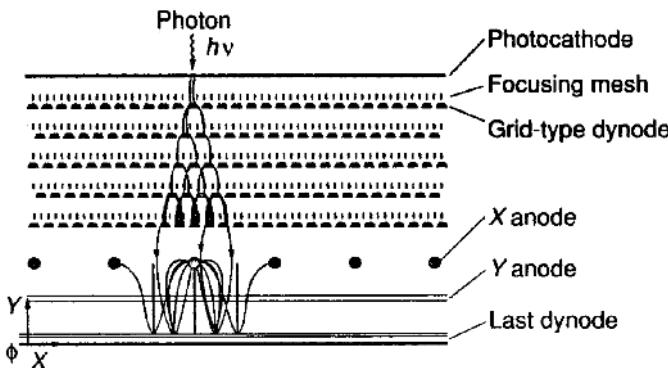


Abb. 2.10. Aufbau eines positionsempfindlichen Photomultipliers

2.6.4 Streak-Kameras

Bei der Messung von ultrakurzen Lichtpulsen kann man auf die *Streak-Kamera* zurückgreifen. Hierbei wird eine zeitliche Information, nämlich die Pulsdauer, über elektrische Ablenkplatten und einen geeigneten Ablenkgenerator in eine räumliche Information umgewandelt. Beim Auftreffen eines Lichtpulses auf eine Photokathode werden zunächst freie Elektronen erzeugt, die dann in Richtung eines Leuchtschirms beschleunigt werden. Im elektrischen Feld zweier Kondensatorplatten wird der Elektronenstrahl in Abhängigkeit seiner zeitlichen Dauer abgelenkt und kann dann als Strich auf dem Leuchtschirm nachgewiesen werden. Die Länge des Strichmusters ist ein Maß für die zeitliche Dauer des Lichtpulses. Abbildung 2.11 illustriert die Funktionsweise einer Streak-Kamera.

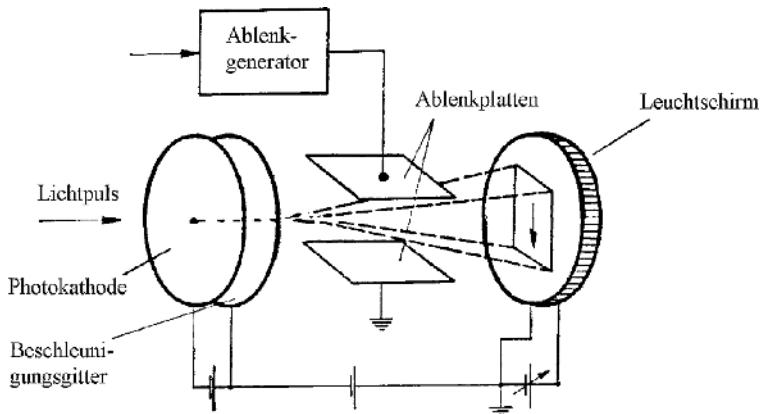


Abb. 2.11. Aufbau einer Streak-Kamera

Literatur

1. Young M (1997) Optik, Laser, Wellenleiter. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
2. Neumann H, Schröder G (1987) Bauelemente der Optik – Taschenbuch der technischen Optik. Hansen, Kassel
3. Schröder G (1990) Technische Optik. Vogel, Würzburg

3 Beugungsoptik

R. Müller und T. Fernholz

3.1 Einführung und einfache Beispiele

3.1.1 Was ist Beugung?

Beugung tritt immer dann auf, wenn aus einem Lichtstrahl oder -bündel ein Teil herausgeschnitten oder behindert wird. Bei ungenauer Betrachtung werfen undurchsichtige Objekte Schatten, die sich leicht mit Hilfe der geometrischen Optik beschreiben lassen. Aber genauso wie Schall in der Lage ist, um ein Hindernis „herumzukommen“, tritt auch ein Teil des Lichts in den Schattenraum ein. Entscheidend für das Ausmaß der Beugung sind die Wellenlänge des Lichts und die Dimensionen des Hindernisses.

3.1.2 Beispiele für Beugung

Für das Auftreten von Beugung finden sich viele Beispiele. Jedem bekannt sind die schillernden Farben von CDs oder die kleinen Ringe, die an Unregelmäßigkeiten im Glaskörper des Auges entstehen, wenn man in den blauen Himmel blickt. Nachteilig wirkt sich Beugung bei optischen Instrumenten wie Mikroskopen oder Teleskopen aus. Dort stellt sie einen limitierenden Faktor für das Auflösungsvermögen dar. Sie wird aber auch ausgenutzt. Beispiele hierfür sind Gitterspektrographen, Hologramme oder die Röntgenstrukturanalyse.

3.1.3 Das Huygens-Fresnel-Prinzip

Beugung lässt sich mit dem Prinzip von Huygens und Fresnel deuten. Dieses Prinzip besagt, dass sich die Ausbreitung einer Welle dadurch beschreiben lässt, dass von jedem Punkt einer Wellenfront sphärische Elementarwellen ausgehen (Abb. 3.1). Diese sekundären Wellen überlagern sich zu einer neuen Wellenfront. Wird ein Teil der Welle abgeschirmt, tragen nur die vom freien Bereich ausgehenden Elementarwellen zur weiteren Ausbreitung bei.

Licht pflanzt sich deshalb geradlinig fort, weil bei einer unendlich gedachten, ebenen Welle aus Symmetriegründen alle neuen Teilwellen nur in Richtung senkrecht zur Front konstruktiv interferieren können. Wird diese Symmetrie durch ein Hindernis gebrochen, kommt es sowohl im Schattenbereich als auch im direkt beleuchteten Bereich zu Interferenzen, die ein räumliches Beugungsmuster erzeugen.

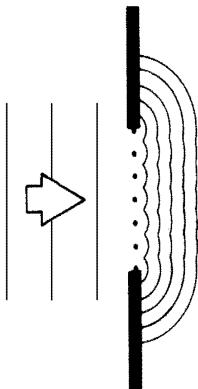


Abb. 3.1. Spalt mit ausgehenden Huygens-Sekundärwellen bzw. Lichtstrahlen.
Nach [3]

3.1.4 Die Beugung am Doppelspalt

In diesem und den beiden folgenden Beispielen wird von der sog. Fraunhofer-Näherung ausgegangen. Das beugende Objekt soll von einer ebenen Welle beleuchtet werden. Die Lichtquelle wird also als punktförmig und in einem unendlichen Abstand vom Objekt angenommen. Außerdem wird auch das Beugungsbild in einem unendlichen Abstand beobachtet. Unter welchen Bedingungen diese Näherung gerechtfertigt ist, wird an späterer Stelle erörtert.

Ein ebener Schirm mit zwei Spalten wird von einer senkrecht zum Schirm einfallenden ebenen Welle beleuchtet (Abb. 3.2). Das elektrische Feld schwingt deshalb an allen Punkten beider Spalte gleichphasig. Die Breite b der Spalte sei viel kleiner als die Wellenlänge und ihr Abstand d . Dann kann vereinfachend davon ausgegangen werden, dass jeweils nur eine einzige zylindrische Elementarwelle aus den Spalten austritt.

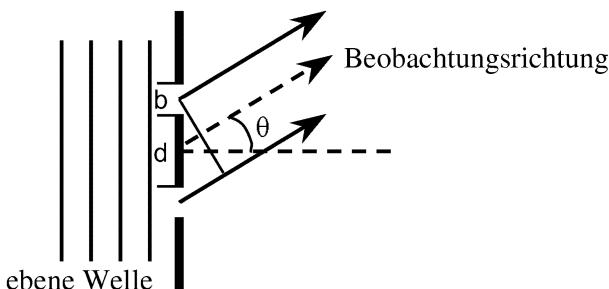


Abb. 3.2. Zur Geometrie des Doppelspalts

Die Beobachtungsrichtung und die Normale schließen den Winkel θ ein. Konstruktive Interferenz tritt nur in solchen Richtungen auf, in denen der Wegunterschied Δs der im Unendlichen interferierenden Strahlen gerade ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge beträgt. Für die Maxima gilt daher:

$$d \cdot \sin \theta_{\max} = m \cdot \lambda, \quad m = 0, \quad \pm 1, \quad \pm 2, \quad \pm 3, \quad \dots$$

Die Minima entstehen bei:

$$d \cdot \sin \theta_{\min} = \left(m - \frac{1}{2}\right) \cdot \lambda, \quad m = \pm 1, \quad \pm 2, \quad \pm 3, \quad \dots$$

Die Zahl m bezeichnet die Beugungsordnung. Es gibt ein maximales m , das dadurch gegeben ist, dass der Sinus den Wert 1 erreicht, also unter einem Winkel von 90° beobachtet wird. Für kleine Winkel θ sind die Maxima alle gleich stark ausgeprägt.

3.1.5 Die Beugung am Einzelspalt

Ein einzelner Spalt wird in Richtung seiner Flächennormalen von einer ebenen Welle beleuchtet, beobachtet wird wiederum im Unendlichen (Abb. 3.3). Ist die Spaltbreite b nicht deutlich kleiner als die Wellenlänge, kann nicht mehr von einer einzeln durchtretenden zylindrischen Welle ausgegangen werden. Vielmehr müssen nun dem Huygens-Fresnel-Prinzip entsprechend alle sekundären Elementarwellen im Spalt berücksichtigt werden.

Für die auftretenden Maxima lässt sich kein einfacher Zusammenhang angeben. Die Minima aber entstehen immer dann, wenn sich zu jedem ausgehenden Lichtstrahl ein zweiter findet, mit dem er ein destruktiv interferierendes Paar bildet. Die Bedingung für die Minima lautet:

$$b \cdot \sin \theta_{\min} = m \cdot \lambda, \quad m = \pm 1, \quad \pm 2, \quad \pm 3, \quad \dots$$

Das entstehende Streifenmuster hat ein zentrales Maximum für $\theta = m = 0$! Die Nebenmaxima sind sehr viel schwächer. Es ergibt sich das Beugungsbild aus Abb. 3.4.

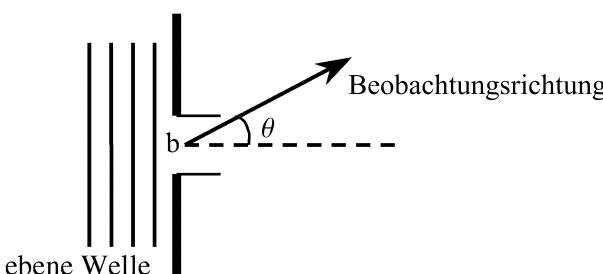


Abb. 3.3. Zur Geometrie des Einzelspalts

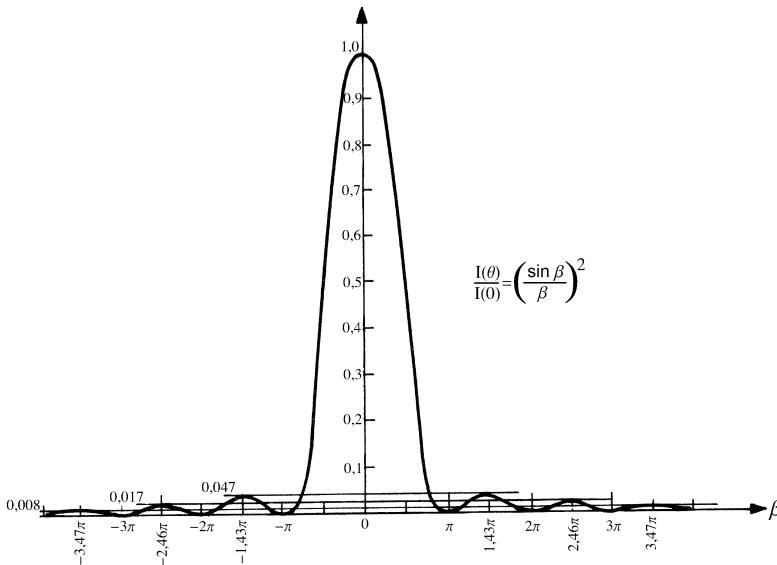


Abb. 3.4. Das Beugungsbild des Einzelspalts. Nach [3]

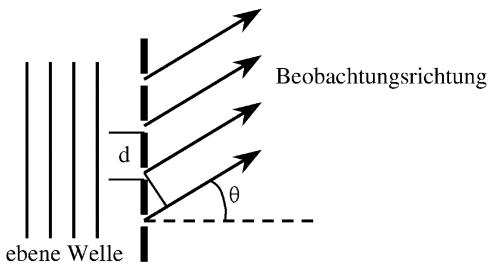


Abb. 3.5. Zur Geometrie des Beugungsgitters

3.1.6 Die Beugung am Gitter

Werden in einem Schirm Spalte in regelmäßigm Abstand angebracht, spricht man von einem Gitter. Der Abstand d zweier benachbarter Spalte heißt *Gitterkonstante*. Die Bedingung für das Auftreten von Maxima ist dieselbe wie beim Doppelspalt. Der Wegunterschied Δs zweier benachbarter Strahlen muss ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge sein. Dadurch interferieren automatisch sämtliche Strahlen konstruktiv, wie in Abb. 3.5 dargestellt:

$$d \cdot \sin \theta_{\max} = m \cdot \lambda, \quad m = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$$

Während die beim Doppelspalt auftretenden Interferenzmaxima breit sind, treten beim Gitter zusätzliche Nebenminima auf. Dadurch werden die Maxi-

ma schmaler. Ist N die Zahl der beleuchteten Spalte, gibt es zwischen je zwei Maxima $N-1$ Minima. Die Bedingung dafür ist ähnlich wie beim Einzelspalt. Es müssen sich paarweise Lichtstrahlen finden lassen, die gerade destruktiv interferieren (im Fall einer geraden Anzahl Spalte).

Gitter werden zur Spektroskopie verwendet. Durch eine große Anzahl von Spalten werden die Maxima so schmal, dass bei Beleuchtung mit polychromatischem Licht die Spektralfarben gut getrennt werden.

3.1.7 Der Einfluss der endlichen Spaltbreite

Häufig sind die Spalte eines Gitters nicht wesentlich schmäler als ihr Abstand. Dann kann nicht davon ausgegangen werden, dass nur eine einzelne Zylinderwelle einen Spalt verlässt. Parallel zur Beugung am Gitter findet eine Beugung an jedem einzelnen Spalt statt. Für das Auftreten konstruktiver Interferenzen muss also nicht nur die Bedingung für das Gitter, sondern auch die für den Einzelspalt erfüllt sein. Andersherum gesprochen, verhindert eine destruktive Interferenz am Einzelspalt das Auftreten eines Maximums. Es zeigt sich, dass sich das resultierende Beugungsbild durch Multiplikation der beiden Beugungsbilder als das „ideale“ Gitter und den Einzelspalt ergibt.

3.2 Die Theorie der Beugung

Die Theorie der Beugung wird im Wesentlichen drei Physikern zugeschrieben:

Christiaan Huygens (1629–1695) war einer der ersten Verfechter der Wellennatur des Lichts. Seine Idee war, dass sich Licht nach und nach ausbreitet, und sich jedes Element einer Fläche, die vom Licht erreicht wird, als sekundäre Quelle verhält und selbst Kugelwellen aussendet.

Augustin-Jean Fresnel (1788–1827) erkannte, dass die sekundären Kugelwellen miteinander interferieren. Die komplexe Amplitude der Lichtschwingerung an einem Punkt ergibt sich als Summe bzw. Integral der komplexen Amplituden, die durch die sekundären Quellen erzeugt worden sind.

Gustav Robert Kirchhoff (1824–1887) stellte das Huygens-Fresnel-Prinzip auf eine mathematische Basis und rechtfertigte die Annahme sekundärer Quellen unter Einführung eines Korrekturterms, dem Neigungsfaktor. Seine Form des Beugungsgesetzes gründete nur in der Differentialgleichung für eine Welle.

3.2.1 Das Beugungsintegral

Eine Welle trifft auf einen Schirm Σ , in dem sich eine Öffnung S befindet (Abb. 3.6). Diese Öffnung lässt sich aus infinitesimalen Flächenelementen dS zusammengesetzt denken. Jedes Element dS ist Ausgangspunkt einer Kugelwelle, die sich im stationären Fall in folgender Form beschreiben lässt:

$$dE(P) = \frac{E_S}{r} e^{-ikr}.$$

Dabei ist dE die komplexe Amplitude der Kugelwelle. In diesem Fall ist das der infinitesimale Beitrag zur Feldstärke an einem Punkt P , der sich in der Entfernung r von dS befindet. E_S ist die Quellstärke der Kugelwelle bzw. der Feldstärkefluss am Ort von dS . Die Wellenzahl ist gegeben durch $k = 2\pi/\lambda$.

Die Interferenz aller Teilwellen im Punkt $P(X, Y, Z)$ lässt sich durch Bildung des Integrals über die Öffnung S erfassen:

$$E(P) = \iint_S Q \cdot E_S \frac{e^{-ikr}}{r} dS.$$

Das ist das fundamentale Beugungsintegral. Der Faktor Q ist der sog. Neigungsfaktor. Er berücksichtigt die Tatsache, dass die gedachten Sekundärwellen nicht wirklich von isolierten Punktquellen ausgehen. Wäre dem so, müssten von der Öffnung natürlich auch Wellen in die entgegengesetzte Richtung zurücklaufen. Durch den Neigungsfaktor breiten sich die Sekundärwellen

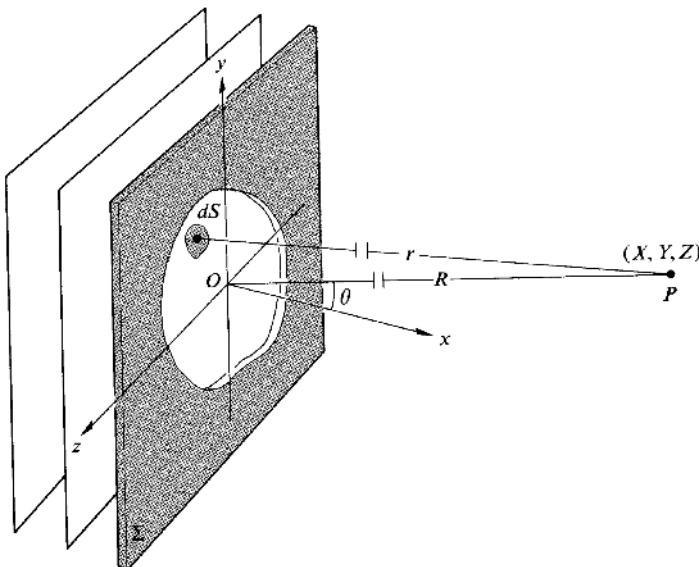


Abb. 3.6. Zur Darstellung des Beugungsintegrals. Nach [3]

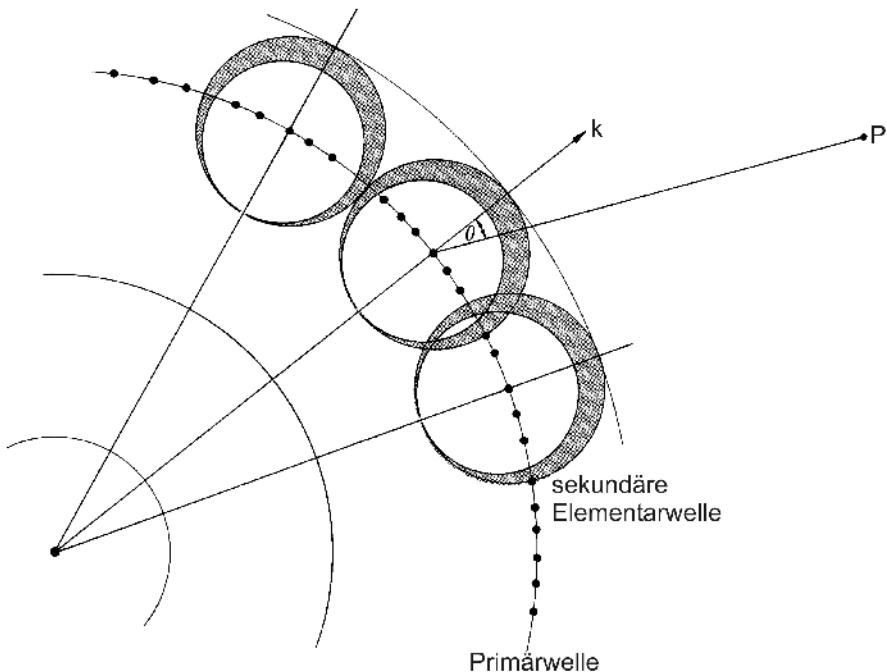


Abb. 3.7. Zum Neigungsfaktor. Nach [3]

nicht mehr isotrop aus und bekommen eine Vorzugsrichtung senkrecht zur Wellenfront.

Der Neigungsfaktor ist gegeben durch

$$Q = \frac{i}{2} (1 + \cos \theta) .$$

Der Faktor Q ist imaginär, um nicht nur die Amplitude der Welle, sondern auch die Phase im Punkt P richtig wiederzugeben. Die korrekte Form des Neigungsfaktors kann mit Hilfe der skalaren Beugungstheorie von Kirchhoff abgeleitet werden (Abb. 3.7).

3.2.2 Das Babinet-Prinzip

Aus dem Beugungsintegral lassen sich direkt weitere Schlüsse ziehen. Da das Bilden eines Integrals eine lineare Operation ist, kann es in beliebig viele Teilintegrale zerlegt werden, die sich über verschiedene Teile der Integrationsfläche erstrecken, wenn diese zusammen wieder die ganze Fläche ergeben:

$$E(P) = E_1(P) + E_2(P) + \dots$$

$$E(P) = \iint_{S_1} Q \cdot E_S \frac{e^{-ikr}}{r} dS + \iint_{S_2} Q \cdot E_S \frac{e^{-ikr}}{r} dS + \dots$$

Das ist das Babinet-Prinzip: Das Beugungsbild einer Öffnung ergibt zusammen mit dem Beugungsbild eines gerade komplementären Schirms die ungestörte Welle, denn beide beugenden Öffnungen zusammen bilden eine unendlich große Öffnung. Dahinter verbirgt sich, dass im Fall der Fraunhofer-Beugung das Beugungsbild einer Öffnung genauso aussieht, wie das des komplementären Schirms. Einzig die Phasen sind genau entgegengesetzt.

3.3 Die Fraunhofer-Beugung

In dem fundamentalen Beugungsintegral ist der Abstand r des Punkts P vom Flächenelement dS natürlich eine Funktion der Koordinaten x und y des Flächenelements. Für den Abstand gilt:

$$r = \sqrt{X^2 + (Y - y)^2 + (Z - z)^2} = R \sqrt{1 - 2 \frac{yY + zZ}{R^2} + \frac{y^2 + z^2}{R^2}}.$$

Aus der Taylor-Entwicklung der Wurzel erhält man

$$r = R \left[1 - \frac{yY + zZ}{R^2} + \frac{y^2 + z^2}{2R^2} - \frac{1}{2} \left(\frac{yY + zZ}{R^2} \right)^2 + \frac{1}{8} \left(\frac{y^2 + z^2}{R^2} \right)^2 \dots \right].$$

$$E(P) = \iint_S Q E_S \frac{e^{-ikR}}{R \left(1 - \frac{yY + zZ}{R^2} + \dots \right)} e^{ik \frac{yY + zZ}{R}} e^{ik \left[\frac{1}{2} \frac{(yY + zZ)^2}{R^3} - \frac{y^2 + z^2}{2R} \right]} dS.$$

Für die Koordinaten des Punkts P gilt in jedem Fall

$$|Y| \leq R \quad \text{und} \quad |Z| \leq R.$$

Für den Extremfall $Y = Z = R$ verschwinden die höheren Ordnungen der Taylor-Entwicklung und damit der letzte Exponent also nur, falls die *Fraunhofer-Bedingung* erfüllt ist:

$$\frac{k(y^2 + z^2)}{2R} \leq \frac{\pi d^2}{4\lambda R} \ll 1.$$

Hier ist d der größte Durchmesser der Öffnung. Ist diese Bedingung erfüllt, kann die Entwicklung des Nenners bereits nach dem nullten Glied abgebrochen werden. Ebenso lässt sich leicht zeigen, dass auch der Neigungsfaktor als konstant angenommen werden kann.

Beim Einfall einer ebenen Welle ist der Feldstärkefluss E_s unabhängig vom Ort, und aus dem Beugungsintegral wird dann

$$E(P) = Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} \iint_S e^{ik \frac{yY+zZ}{R}} dS.$$

Unter den gemachten Annahmen wird also das Beugungsintegral zu einem Fourier-Integral.

3.3.1 Die Berechnung einer rechteckigen Blende

Mit der gewonnenen Formel soll das Beugungsbild einer rechteckigen Blende aus Abb. 3.8 berechnet werden. In einer Dimension sollte sich dabei das Beugungsbild des Spalts ergeben.

Mit der Breite a und der Höhe b der Blende wird das Beugungsintegral zu

$$E(P) = Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} \int_{-\frac{a}{2}}^{+\frac{a}{2}} e^{ik \frac{yY}{R}} dy \cdot \int_{-\frac{a}{2}}^{+\frac{a}{2}} e^{ik \frac{zZ}{R}} dz.$$

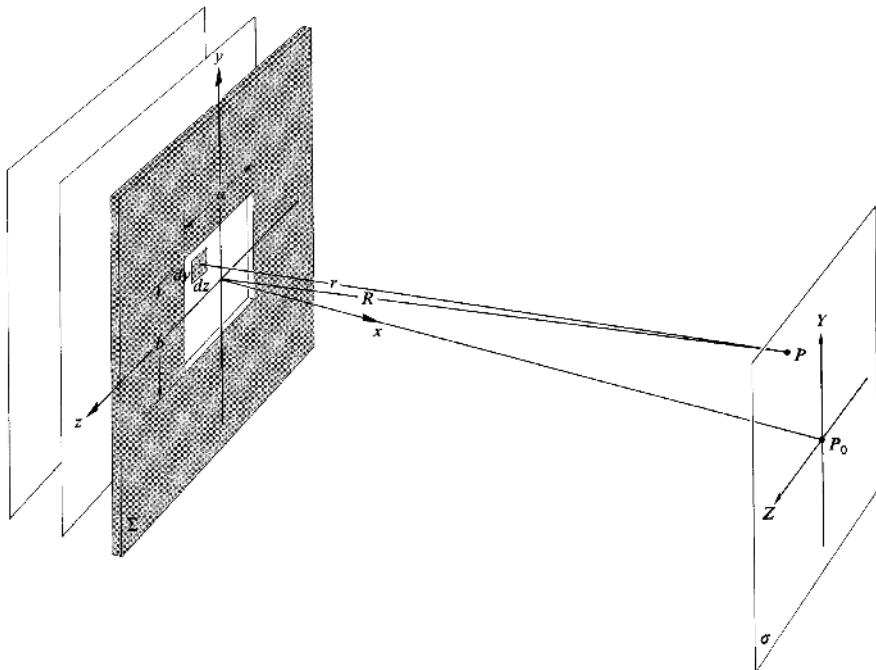


Abb. 3.8. Die rechteckige Blende. Nach [3]

Dabei ist das Flächenelement dS gegeben durch $dy \cdot dz$. Mit den Substitutionen $\alpha = kaY/2R$ und $\beta = kbZ/2R$ folgt:

$$\int_{-\frac{a}{2}}^{+\frac{a}{2}} e^{ik\frac{yY}{R}} dy = a \frac{e^{i\alpha} - e^{-i\alpha}}{2i\alpha} = a \frac{\sin \alpha}{\alpha}$$

und entsprechend

$$\int_{-\frac{b}{2}}^{+\frac{b}{2}} e^{ik\frac{zZ}{R}} dz = b \frac{\sin \beta}{\beta}.$$

Die beobachtbare Intensitätsverteilung ergibt sich aus dem halben Betragsquadrat der elektrischen Feldstärkeamplitude:

$$I(Y, Z) = \left(Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} \cdot ab \right)^2 \cdot \left(\frac{\sin \alpha}{\alpha} \right)^2 \cdot \left(\frac{\sin \beta}{\beta} \right)^2.$$

Es ergibt sich eine ähnliche Intensitätsverteilung, wie sie bereits beim Einzelspalt dargestellt wurde, allerdings als Produkt der zwei Funktionen für die einzelnen Dimensionen der Blende.

3.3.2 Die Beugung an einer kreisförmigen Blende

Genau wie bei der rechteckigen Öffnung aus Abb. 3.8 soll auch die Beugung an einer runden Öffnung in Abb. 3.9 unter Annahme der Fraunhofer-Näherung berechnet werden. Diese Berechnung ist von besonderer Bedeutung für optische Instrumente, da die verwendeten Linsen meistens rund sind. Die Beugung an diesen Linsen führt zur Auflösungsgrenze eines abbildenden Instruments.

Entsprechend der Geometrie einer runden Öffnung ist es zweckmäßig, Polarkoordinaten einzuführen. Für die Koordinaten der Öffnung soll gelten:

$$z = \rho \cos \phi \quad \text{und} \quad y = \rho \sin \phi.$$

Die Koordinaten der Beobachtungsebene sind gegeben durch

$$Z = q \cos \Phi \quad \text{und} \quad Y = q \sin \Phi.$$

Das Flächenelement dS ist in Polarkoordinaten durch $\rho d\phi d\rho$ gegeben. Mit den eingeführten Koordinaten ergibt sich

$$E(P) = Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} \int_{\rho=0}^a \int_{\phi=0}^{2\pi} e^{i\left(\frac{k\rho q}{R}\right) \cos(\phi - \Phi)} \rho d\phi d\rho.$$

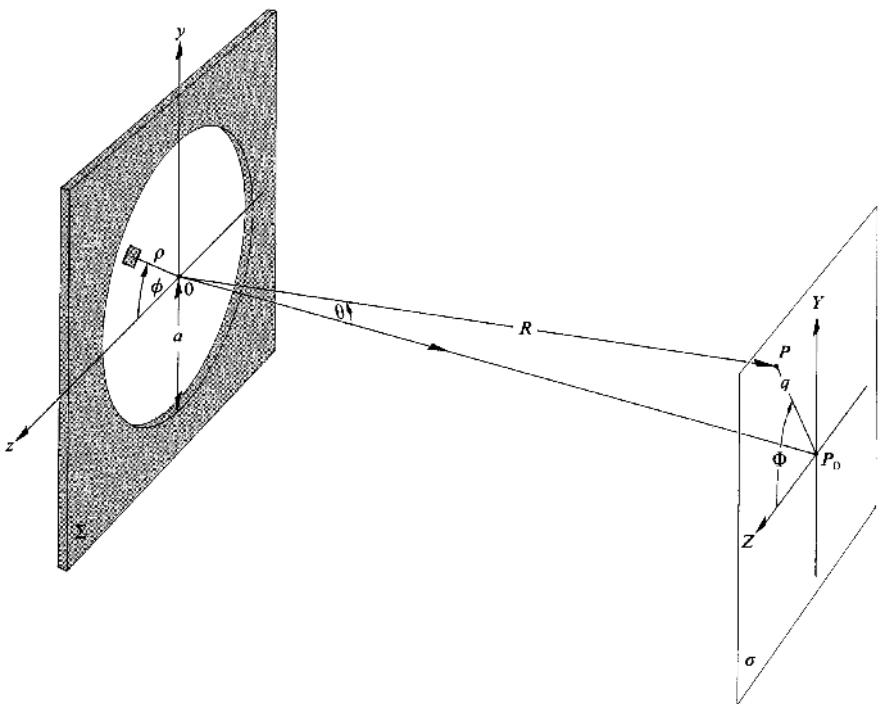


Abb. 3.9. Die kreisförmige Blende. Nach [3]

Das auftretende Winkelintegral

$$\int_{\phi=0}^{2\pi} e^{i(\frac{k\rho q}{R}) \cos \phi} d\phi = 2\pi \cdot J_0 \left(\frac{k\rho q}{R} \right)$$

ist bekannt unter dem Namen Bessel-Funktion nullter Ordnung.

Die Bessel-Funktionen treten sehr häufig bei zylindersymmetrischen Problemen auf. Ganz allgemein sind sie definiert durch

$$J_m(u) = \frac{i^{-m}}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{i(m\nu + u \cos \nu)} d\nu.$$

Die Bessel-Funktionen sind langsam abnehmende, annähernd periodische Funktionen, wie aus Abb. 3.10 zu erkennen ist. Mit aufsteigender Ordnung zeigen sie wechselnde Symmetrie. Sie sind daher mit den trigonometrischen Funktionen vergleichbar.

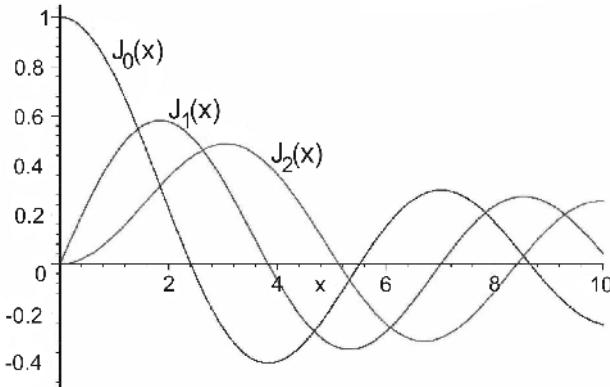


Abb. 3.10. Die ersten drei Bessel-Funktionen. Nach [3]

Das Beugungsintegral lässt sich mit Hilfe der Bessel-Funktion wie folgt schreiben:

$$E(P) = Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} 2\pi \int_{\rho=0}^a J_0 \left(\frac{k\rho q}{R} \right) \rho d\rho.$$

An dieser Stelle lässt sich ein nützlicher Zusammenhang der Bessel-Funktionen ausnutzen. Die Bessel-Funktion erster Ordnung lässt sich darstellen durch

$$J_1(u) = \frac{1}{u} \int_0^u u' J_0(u') du'.$$

Mit der Substitution $\omega = k\rho q/R$ lässt sich das Beugungsintegral insgesamt wie folgt schreiben:

$$\begin{aligned} E(P) &= Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} 2\pi \cdot \left(\frac{R}{kq} \right)^2 \int_{\omega=0}^{\omega=\frac{kqa}{R}} J_0(\omega) \omega d\omega \\ &= 2\pi a^2 \cdot Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} \cdot \frac{R}{kaq} J_1 \left(\frac{kaq}{R} \right). \end{aligned}$$

Die beobachtbare Intensitätsverteilung ist wiederum durch das halbe Beitragsquadrat der elektrischen Feldstärke gegeben:

$$I(P) = 2 \left(\pi a^2 \cdot Q \cdot E_S \frac{e^{-ikR}}{R} \right)^2 \cdot \left[\frac{R}{kaq} J_1 \left(\frac{kaq}{R} \right) \right]^2.$$

Wie zu erwarten war, ist das Beugungsbild unabhängig von der Winkelkoordinate und deshalb rotationssymmetrisch.

Soll die Intensität im Zentrum des Beugungsmusters bestimmt werden, ist zu beachten, dass sowohl die Bessel-Funktion J_1 als auch der Nenner der

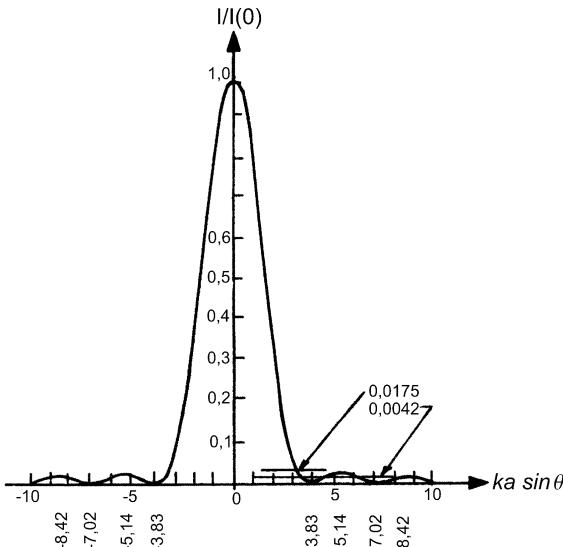


Abb. 3.11. Radiale Intensitätsverteilung des Beugungsbildes einer kreisförmigen Öffnung. Nach [3]

zweiten Klammer für $q = 0$ verschwinden. Der Grenzwert lässt sich mit der L'Hôpital-Regel zu $1/2$ bestimmen. Deshalb wird die Intensität im Zentrum

$$I(0) = \frac{1}{2} \left(\pi a^2 \cdot Q \cdot E \frac{e^{-ikR}}{R} \right)^2.$$

Identifiziert man πa^2 mit der Fläche der Öffnung, ergibt sich dasselbe Ergebnis wie bei der rechteckigen Blende.

Wenn R als konstant angenommen wird, also für kleine Winkel θ , wird unter Beachtung von $\sin \theta = q/R$ das Beugungsmuster beschrieben durch

$$I(\theta) = I(0) \cdot \left[\frac{2J_1(ka \sin \theta)}{\sin \theta} \right]^2.$$

Die in Abb. 3.11 dargestellte Funktion zeigt die radiale Intensitätsverteilung des Beugungsbildes einer kreisförmigen Öffnung. Das Beugungsbild besteht aus einem hellen Kreis, dem Airy-Scheibchen, umgeben von konzentrischen Ringen abnehmender Intensität. Diese Ringe heißen Airy-Ringe. Die dunklen Ringe entsprechen den Nulldurchgängen der Bessel-Funktion erster Ordnung. Die erste Nullstelle findet sich bei $u = 3,83$. Der Radius der ersten Dunkelzone ist deshalb gegeben durch

$$q_1 = 1,22 \frac{R\lambda}{2a}.$$

3.3.3 Das Auflösungsvermögen eines optischen Instruments

Für ein optisches System kann die Entfernung R , also die Entfernung der Abbildungsebene von der Linse, durch die Brennweite f abgeschätzt werden. Mit dem Linsendurchmesser D ergibt sich eine wesentliche Formel für optische Instrumente:

$$q_1 = 1,22 \frac{f\lambda}{D}.$$

Der Durchmesser eines Airy-Scheibchens ist bei sichtbarer Strahlung in grober Näherung gleich dem reziproken Öffnungsverhältnis oder der f -Zahl in Millionstel Meter. Für die Entwicklung von Mikroskopen ist das von großer Bedeutung. Selbst bei einem idealen Linsensystem, d.h. ohne Aberrationen, können die Bildpunkte bei sehr kleinen Strukturen nicht eindeutig den Objektpunkten zugeordnet werden. Ab einer gewissen Objektgröße macht sich immer die Beugung bemerkbar. Selbst „unendlich“ kleine Objektpunkte erscheinen mindestens in der Größe eines Airy-Scheibchens. Dadurch kommt es zu einer nicht unterschreitbaren Auflösungsgrenze. Man spricht von der beugungsbegrenzten Abbildung. Der Radius des Airy-Scheibchens wird kleiner, je größer der Linsendurchmesser oder je kleiner die Wellenlänge ist. Deshalb werden in der Lichtmikroskopie Immersionsölobjektive eingesetzt. Das Öl hat einen hohen Brechungsindex und verkürzt damit die Wellenlänge, wodurch eine bessere örtliche Auflösung möglich wird.

Die Auflösungsgrenze kann auf verschiedene Weisen definiert werden. In Abb. 3.12 sind jeweils zwei Beugungsbilder dargestellt, die durch zwei punktförmige Lichtquellen entstehen würden. Für die eindeutige Trennbarkeit der beiden Bilder gibt es verschiedene Kriterien. Das Rayleigh-Kriterium besagt, dass zwei Bildpunkte als gerade noch getrennt angesehen werden können, wenn das Zentrum des einen Airy-Scheibchens in die erste Dunkelzone des anderen fällt. Die Resultierende zeigt ein kleines Minimum zwischen beiden Maxima, und eine Unterscheidung ist möglich. Wird der Abstand verkleinert, verschwindet schließlich das Minimum, und das Sparrow-Kriterium ist erreicht. Wie die Praxis gezeigt hat, ist letzteres das realistischere Unterscheidbarkeitskriterium.

3.4 Fresnel-Beugung

Eine etwas andere Näherung des Beugungsintegrals stammt von Fresnel. Es zeigt sich, dass diese Näherung auch im Nahfeldbereich hinter einem beugenden Objekt angewendet werden kann. Zur Verdeutlichung wird die Geometrie an einer rechteckigen Blende dargestellt.

Der Nullpunkt der Anordnung aus Abb. 3.13 sei durch den Schnittpunkt der Verbindungsgeraden zwischen Quelle und Beobachtungspunkt mit der Öffnung gegeben.

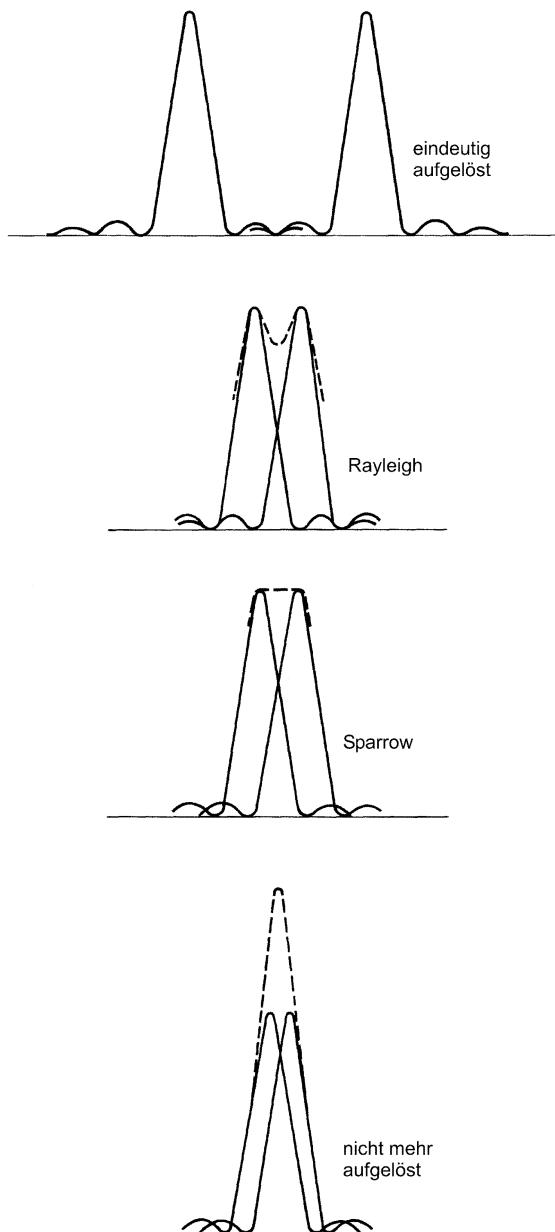


Abb. 3.12. Verschiedene Auflösungskriterien. Nach [3]

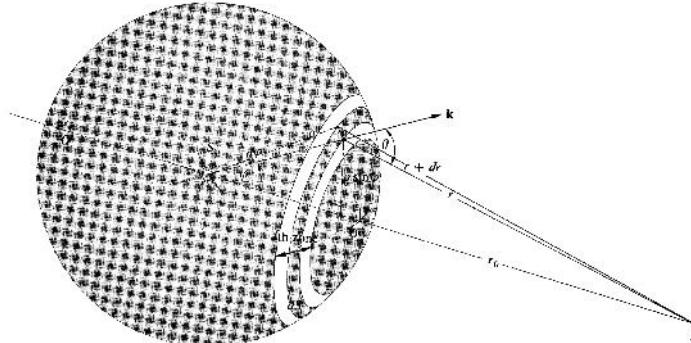


Abb. 3.13. Zur Fresnel-Beugung an einer rechteckigen Öffnung. Nach [3]

Ist die Quelle nicht unendlich weit von der Öffnung entfernt, muss sie als Kugelwelle betrachtet werden. Für den Feldstärkefluss am Ort des Flächen-elements dS gilt

$$E_S = \frac{E_0}{\rho\lambda} e^{-ik\rho}.$$

Diese Gleichung stammt, wie auch der korrekte Neigungsfaktor Q , aus der Kirchhoff-Beugungstheorie. Das Beugungsintegral wird damit zu

$$E(P) = \iint_S Q \cdot E_0 \frac{e^{-ik(\rho+r)}}{\rho r \lambda} dS.$$

Die Abstände ρ und r sind die Abstände des Flächenelements von der Lichtquelle und vom Beobachtungspunkt.

Wenn die Öffnung klein gegenüber den Abständen ist, können der Neigungsfaktor und der Nenner als konstant angenommen werden. Bei der geforderten Geometrie ist der Neigungsfaktor 1. Da der Exponent weit empfindlicher von der Näherung abhängt, müssen hier mehr Entwicklungsterme berücksichtigt werden.

Die Summe der beiden Abstände ist gegeben durch

$$\rho + r = \sqrt{\rho_0^2 + y^2 + z^2} + \sqrt{r_0^2 + y^2 + z^2}.$$

Näherungsweise ergibt sich

$$\rho + r = \rho_0 + r_0 + y^2 + z^2 \frac{\rho_0 + r_0}{2\rho_0 r_0}.$$

Das Beugungsintegral wird dann zu

$$E(P) = \frac{E_0}{\rho_0 r_0 \lambda} e^{-ik(\rho_0 + r_0)} \iint_S e^{-ik((y^2 + z^2) \frac{\rho_0 + r_0}{2\rho_0 r_0})} dS.$$

Es lassen sich die Variablen u und v einführen, sodass gilt:

$$u = y \sqrt{\frac{2(\rho_0 + r_0)}{\rho_0 r_0 \lambda}} \quad \text{und} \quad v = z \sqrt{\frac{2(\rho_0 + r_0)}{\rho_0 r_0 \lambda}}.$$

Das Beugungsintegral lässt sich dann schreiben als

$$E(P) = \frac{E_0}{2(\rho_0 + r_0)} e^{-ik(\rho_0 + r_0)} \int_{u_1}^{u_2} \int_{v_1}^{v_2} e^{i\pi u^2/2} \cdot e^{i\pi v^2/2} \cdot dv du.$$

Wird zusätzlich noch gefordert, dass die Integrationsfläche rechteckig ist, kann das Integral separiert werden. Die Integrationsgrenzen v_1 und v_2 sind also unabhängig von u , und das Integral zerfällt in ein Produkt. Die auftretenden Integrale werden Fresnel-Integrale genannt. Sie sind wie folgt definiert:

$$C(w) = \int_0^w \cos \frac{\pi w'^2}{2} dw' \quad \text{und} \quad S(w) = \int_0^w \sin \frac{\pi w'^2}{2} dw'.$$

Beachtet man noch, dass der Term vor dem Integral gerade Hälfte der ungestörten Welle E_U darstellt, erhält man

$$E(P) = \frac{E_U}{2} \{C(u) + iS(u)\}_{u_1}^{u_2} \cdot \{C(v) + iS(v)\}_{v_1}^{v_2}.$$

Die Auswertung des Integrals für alle Punkte der Beobachtungsebene ist recht kompliziert. Allerdings ergibt sich noch eine Vereinfachung, wenn nicht der Beobachtungspunkt sondern die Öffnung „bewegt“ wird. Dann ändern sich nur die Begrenzungswerte der Integrale. Das Beugungsbild wird dabei über den Punkt P hinweggeschoben. Der Fehler, der dabei gemacht wird, ist klein, wenn der Abstand der Lichtquelle von der Öffnung viel größer ist als die Ausmaße der Öffnung. Das ist besonders beim Einfall einer ebenen Welle der Fall.

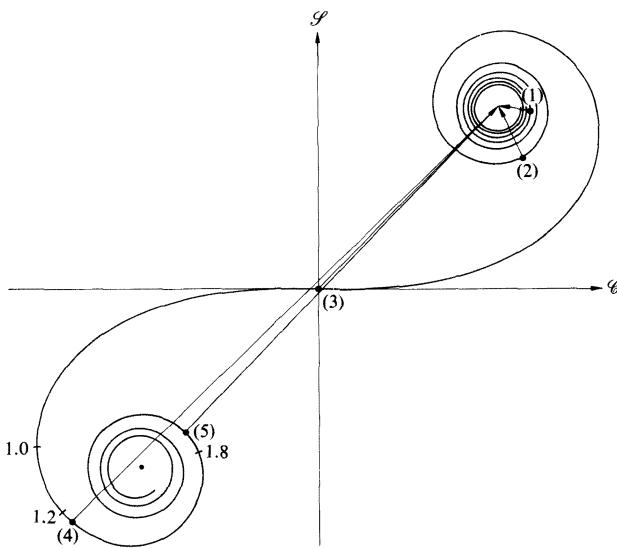
3.4.1 Die Cornu-Spirale

Die aus den Fresnel-Integralen zusammengesetzte komplexe Funktion

$$B(w) = C(w) + i \cdot S(w)$$

lässt sich in der komplexen Ebene darstellen. Der Graph der Funktion (Abb. 3.14a) ist die Cornu-Spirale. Es ist leicht einzusehen, dass der Kur-

a



b

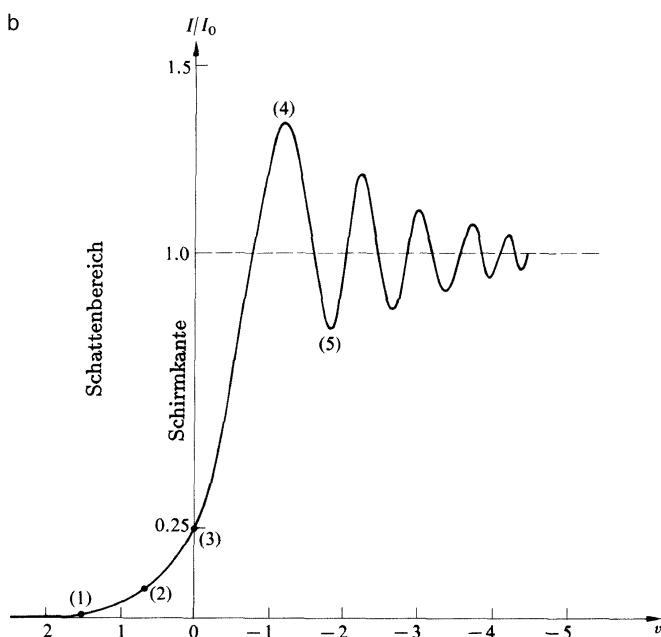


Abb. 3.14. Die Cornu-Spirale (a) und die Beugung an einer Kante (b). Nach [3]

venparameter w gerade die Bogenlänge der Spiralkurve ist.¹ Definiert man

$$B_{12}(w) = \{C(w) + i \cdot S(w)\}_{w_1}^{w_2},$$

dann ergibt sich für die Intensität des Beugungsbildes (Abb. 3.14b)

$$I(P) = \frac{I_0}{4} |B_{12}(u)|^2 \cdot |B_{12}(v)|^2.$$

Das bedeutet, dass sich die Intensität aus den Längen der Differenzvektoren $B_{12}(u)$ und $B_{12}(v)$ bestimmen lässt. Für jede Position der Blende werden also die Integrationsgrenzen bestimmt, in u und v umgerechnet und an der Cornu-Spirale abgetragen. Damit ist eine „relativ“ einfache geometrische Methode gegeben, um ein Beugungsbild zu bestimmen. Als Beispiel ist hier die Beugung an einer Kante dargestellt. Das Problem variiert nur noch in einer Dimension, sodass nur ein Differenzvektor bestimmt werden muss. Die eine Integrationsgrenze liegt immer im Unendlichen (offener Halbraum). Deshalb liegt die Spitze des Differenzvektors immer im Zentrum des einen Spiralarms. Liegt die Kante genau auf der Verbindungsgeraden zwischen P und der Lichtquelle, ist die andere Integrationsgrenze gerade Null, der Fußpunkt des Vektors liegt im Ursprung. Die Intensität ist demnach von Null verschieden. Die Graphik zeigt den Intensitätsverlauf hinter einer Kante. Beispielhaft sind 5 verschiedene Differenzvektoren eingezeichnet.

Literatur

1. Gerthsen C, Vogel H (1993) Physik. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
2. Haferkorn H (1994) Optik. Barth, Leipzig Heidelberg
3. Hecht E (1989) Optik. Addison-Wesley, Bonn
4. Perez J-P (1996) Optik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
5. Recknagel A (1986) Optik. VEB Verlag Technik, Berlin

¹ Für das Linienelement dl der Spiralkurve gilt

$$dl^2 = dC^2 + dS^2.$$

Die Differentiale der Funktionen C und S sind gegeben durch

$$dC = \cos \frac{\pi w^2}{2} dw \quad \text{und} \quad dS = \sin \frac{\pi w^2}{2} dw.$$

Demnach gilt:

$$dl^2 = \left(\cos^2 \frac{\pi w^2}{2} + \sin^2 \frac{\pi w^2}{2} \right) dw^2 = dw^2.$$

4 Kohärente Optik

R. Grimm

In diesem Beitrag werden einige Grundbegriffe erläutert, die für die Optik mit Laserlicht von zentraler Bedeutung sind. Wir führen den Begriff der Kohärenz ein, betrachten die räumliche Ausbreitung eines kohärenten Laserstrahls und beschreiben elementare Grundlagen der resonanten optischen Wechselwirkung von Laserlicht mit Materie.

Das von Lasern emittierte Licht zeichnet sich gegenüber klassischen Lichtquellen wie der Sonne oder Glühlampen durch eine außerordentlich hohe Interferenzfähigkeit aus. Diese elementare Kohärenzeigenschaft des Laserlichts hat weitreichende Konsequenzen und eröffnet eine Vielzahl von wichtigen Anwendungsmöglichkeiten wie z.B. die Laserinterferometrie und die Holographie.

In diesem Beitrag kann das gesamte Gebiet der Optik mit kohärentem Licht selbstverständlich nicht umfassend behandelt werden; hierzu sei der Leser auf weiterführende Literatur verwiesen. Wir wollen uns hier auf die Einführung und Klärung einiger wesentlicher Grundbegriffe beschränken.

Im ersten Teil werden wir uns mit dem Kohärenzbegriff an sich befassen und ihn genauer erläutern und spezifizieren, indem wir die zeitliche und räumliche Kohärenz diskutieren. Im zweiten Teil werden wir die Ausbreitung von kohärentem Licht betrachten und den Lichtstrahl, den eine Laserquelle emittiert, als einen sog. Gauß-Strahl beschreiben. Aus diesem Modell lässt sich dann u.a. ableiten, unter welchen Bedingungen eine optimale Fokussierung des Laserlichts z.B. für eine medizinische Anwendung erreichbar ist. Im dritten Teil werden wir Grundelemente der resonanten optischen Wechselwirkung mit Materie betrachten, die Begriffe Absorption und Dispersion einführen und den Zusammenhang mit der Lasertheorie diskutieren.

4.1 Der Kohärenzbegriff

Dem Begriff der Kohärenz kommt in der Optik mit Laserlicht eine besondere Bedeutung zu, da hier die Wellennatur des Lichts im Gegensatz zur geometrischen Strahlenoptik eine zentrale Rolle spielt und auch den Schlüssel zu vielen neuen Anwendungen liefert.

4.1.1 Interferenzfähigkeit des Lichts

Die Fähigkeit zur Interferenz, die das Licht aufgrund seiner Wellennatur aufweist, ist das grundlegende Kohärenzphänomen, das für viele praktische

Anwendungen große Bedeutung hat. So wird der Begriff der Kohärenz, obwohl er sich nach heutiger Definition ganz allgemein auf alle möglichen Korrelationseigenschaften eines Lichtfeldes bezieht, sehr oft mit dem der Interferenzfähigkeit des Lichts (Kohärenz erster Ordnung) gleichgesetzt. Auch wir wollen hier, ohne auf abstraktere Lichteigenschaften (Kohärenz höherer Ordnung) einzugehen, die Kohärenz in diesem Sinne beschreiben.

Lichtfelder können wir dann als interferenzfähig betrachten, wenn feste Phasenbeziehungen bestehen. Um dies zu verdeutlichen, betrachten wir zwei Lichtwellen, die am betrachteten Ort durch die elektrischen Feldstärken¹

$$E_i(t) = A_i \cos(\omega t + \phi_i) \quad (4.1)$$

mit den Amplituden A_i und Phasen ϕ_i ($i = 1, 2$) beschrieben werden. Für die Gesamtintensität I der beiden überlagerten Felder ergibt sich durch Quadrierung der resultierenden Feldstärke und zeitliche Mittelung über den schnell oszillierenden Anteil ($\langle \dots \rangle$) der Ausdruck

$$I \propto \langle (E_1 + E_2)^2 \rangle = \frac{1}{2} A_1^2 + \frac{1}{2} A_2^2 + A_1 A_2 \cos \Delta\phi. \quad (4.2)$$

Die Gesamtintensität ergibt sich damit als Summe der beiden einzelnen Intensitäten ($\propto A_i^2$) und eines zusätzlichen Interferenzterms ($\propto A_1 A_2$). Aufgrund des letzteren variiert die Intensität mit der relativen Phase $\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2$, wie Abb. 4.1a für den Fall gleicher Intensitäten der beiden beteiligten Felder zeigt: Es kommt zu konstruktiver ($\phi = n \cdot 2\pi$) und destruktiver Interferenz ($\phi = (n + \frac{1}{2}) \cdot 2\pi$).

Die relative Phase beider Felder kann aber ihrerseits zeitliche Fluktuationen aufweisen. In Abb. 4.1b ist die Interferenz für einen Fall dargestellt, in dem die Phasendifferenz um den Mittelwert $\Delta\phi$ mit einer Schwankungsbreite von ca. $\pi/2$ fluktuiert. Die Phasenschwankungen führen zu schnellen Intensitätsschwankungen, die in Praxis i. Allg. so schnell sind, dass sie nicht aufgelöst werden können. Der Beobachter sieht dann eine mittlere Intensität als Funktion der Phase, entsprechend der gestrichelten Linie in Abb. 4.1b. Damit tritt ein deutlicher Verlust des Interferenzkontrastes auf, denn eine konstruktive bzw. destruktive Interferenz tritt nur partiell auf. Abbildung 4.1c zeigt den Fall einer sehr großen Phasenfluktuation mit Abweichungen $\gg 2\pi$. In der mittleren Intensität ist der Interferenzkontrast völlig verschwunden.

In den meisten praktischen Fällen reicht es völlig aus, einen der beiden Extremfälle zu betrachten: Bei konventionellem Licht (z.B. Sonne oder Glühlampe) sind die Phasenfluktuationen so groß, dass Interferenzeffekte in der Regel vernachlässigt werden können. Sind die beiden beteiligten Lichtfelder von der gleichen Laserlichtquelle abgeleitet, liegt oft der phasenstarre Fall vor, sodass die Interferenz in vollem Maß auftritt.

¹ Wir beschränken uns auf den Fall, dass die interferierenden Felder gleich polarisiert sind und wir die Feldstärken in skalarer Form ausdrücken können.

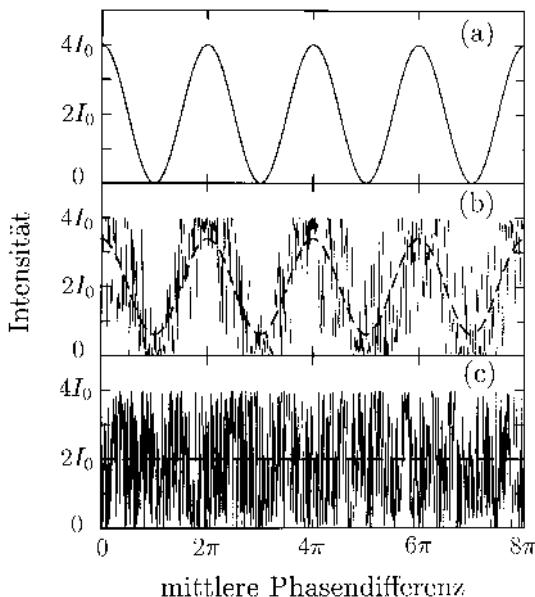


Abb. 4.1. Illustration der Interferenz von zwei Lichtfeldern in Abhängigkeit einer mittleren relativen Phase. (a) phasenstarrer Fall, (b) mit mäßiger Fluktuation der relativen Phase, (c) mit starker Fluktuation. Die *gestrichelten Linien* in (b) und (c) zeigen die über die Fluktuation gemittelte Intensität, wie sie ein Beobachter sieht

Den Begriff der Kohärenz eines Lichtfeldes können wir nun über die Fähigkeit des Feldes zur Interferenz mit sich selbst einführen. Hierzu betrachtet man es zu verschiedenen Zeiten oder an verschiedenen Orten und untersucht in einer geeigneten experimentellen Anordnung den Kontrast bei der Interferenz. Hierbei wird häufig eine Einteilung in zwei Klassen vorgenommen, indem man, wie im Folgenden näher erläutert, die sog. zeitliche und räumliche Kohärenz unterscheidet.

4.1.2 Zeitliche Kohärenz

Die zeitliche Kohärenz beschreibt, inwieweit das betrachtete Lichtfeld $E(\mathbf{r}, t)$ an einem festen Ort \mathbf{r} zu verschiedenen Zeiten eine feste Phasenbeziehung aufweist. Hierzu untersucht man entsprechend (4.2) die mögliche Interferenz von $E_1 = E(\mathbf{r}, t)$ und $E_2 = E(\mathbf{r}, t + \tau)$ als Funktion der Zeitdifferenz τ , im Mittel über die Zeit t betrachtet. Diese Zeitmittelung entspricht der in Abb. 4.1 illustrierten Mittelung über die Phasenfluktuationen. Typischerweise wird man für hinreichend kleine Zeitdifferenzen $\tau \ll \tau_c$ eine vollständige Interferenz feststellen, die dann bei großen Zeitdifferenzen $\tau \gg \tau_c$ verschwindet. Der Übergang zwischen Kohärenz und Inkohärenz wird dabei durch die sog. *Kohärenzzeit* τ_c charakterisiert.

Die Kohärenzzeit ist dementsprechend ein Maß dafür, über welche Zeit hinweg man eine Lichtwelle als phasenstarre Sinusschwingung betrachten kann. In einem Zeitabstand τ_c beginnen Phasenfluktuationen deutliche Einflüsse auf den Interferenzkontrast zu haben. Da Phasenschwankungen auch eine gewisse Unbestimmtheit der Frequenz bedingen, hängt die Kohärenzzeit τ_c mit einer endlichen spektralen Breite $\Delta\nu$ des Lichts zusammen. Wie sich durch eine Fourier-Analyse zeigen lässt, gilt näherungsweise die einfache Beziehung

$$\tau_c \approx \frac{1}{2\pi\Delta\nu}. \quad (4.3)$$

Wenn wir ein Lichtfeld betrachten, das sich in einer festgelegten Richtung mit der Geschwindigkeit \mathbf{c} ausbreitet (wie z.B. der von einem Laser emittierte Strahl), gilt $E(\mathbf{r}, t + \tau) = E(\mathbf{r} - \mathbf{c}\tau, t)$, und die Frage der Kohärenz zu den verschiedenen Zeitpunkten t und $t + \tau$ ist gleichbedeutend mit der Kohärenz an den verschiedenen Orten \mathbf{r} und $\mathbf{r} - \mathbf{c}\tau$, deren Verbindungsgeraden auf die Lichtquelle weist. Der Kohärenzzeit entsprechend definiert man daher die sog. *Kohärenzlänge*

$$l_c = c\tau_c. \quad (4.4)$$

Der Einfluss der Kohärenzzeit bzw. -länge lässt sich experimentell sehr schön mit Hilfe eines Michelson-Interferometers demonstrieren (Abb. 4.2). Der einlaufende Lichtstrahl wird dabei zunächst durch einen halbdurchlässigen Spiegel in zwei gleich intensive Teilstrahlen aufgespalten. Diese werden dann durch hochreflektierende Spiegel in sich zurückgeworfen und durch den halbdurchlässigen Spiegel wieder überlagert. Im Experiment beobachtet man die Gesamtintensität I_1 des Ausgangsstrahls als Funktion der Weglängendifferenz Δx zwischen den beiden Interferometerarmen, die sich durch Verschieben eines der rückreflektierenden Spiegel leicht variieren lässt.

Bei Verwendung von kohärentem Licht beobachtet man das in Abb. 4.2 dargestellte, obere Interferenzmuster, das eine vollständige Modulation der Ausgangsintensität zwischen 0 und I_0 zeigt. Im Fall geringer zeitlicher Kohärenz zeigt sich nur dann ein Interferenzmuster, wenn Δx klein ist. Für $\Delta x \gg \tau_c$ zeigen sich keine Interferenzeffekte, und der Ausgangsstrahl hat einfach die Summenintensität der beiden Teilstrahlen. Das untere Interferenzmuster in Abb. 4.2 entspricht dem Fall einer Kohärenzlänge τ_c von nur wenigen optischen Wellenlängen λ .

„Weißes“ Licht, wie es von der Sonne oder einer Glühlampe emittiert wird, hat eine spektrale Breite $\Delta\nu$, die vergleichbar ist mit der Zentralfrequenz ν der Emission. Aus (4.3) und (4.4) ergibt sich so eine Kohärenzlänge von $\sim \lambda/(2\pi)$, die (bis auf den Faktor 2π) der Zentralwellenlänge $\lambda = c/\nu$ der Emission entspricht. So zeigt das Michelson-Interferometer für „weißes“ Licht nur ein einziges ausgeprägtes Maximum der Ausgangsintensität bei $\Delta x = 0$, und weitere Interferenzmaxima werden kaum beobachtet. Durch spektrale

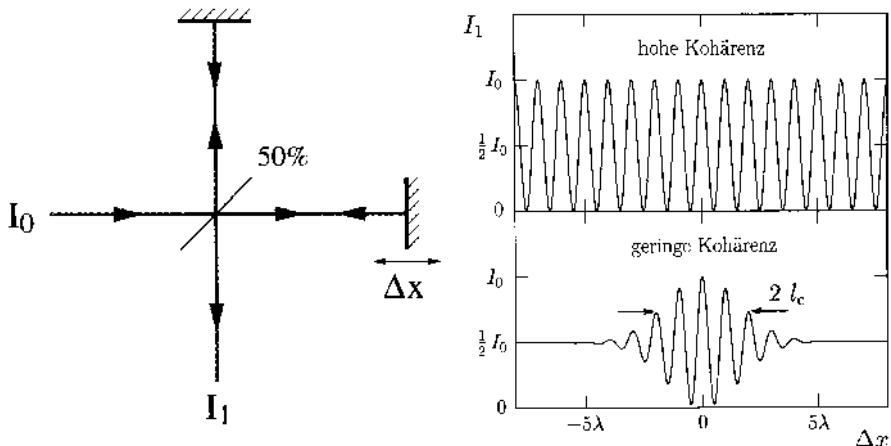


Abb. 4.2. Messung der zeitlichen Kohärenz mit einem Michelson-Interferometer. Die beiden dargestellten Interferenzmuster zeigen den Fall perfekter und geringer Kohärenz

Filterung des weißen Lichts lässt sich die spektrale Breite des Lichts (auf Kosten der Gesamtintensität) deutlich einengen, wobei sich Kohärenzlängen von ca. 100λ ($\sim 50 \mu\text{m}$) verhältnismäßig leicht erreichen lassen. Gute Spektrallampen (z.B. Quecksilberdampflampen) können durchaus Licht mit einer Spektralbreite von $\sim 1 \text{ GHz}$ liefern, wodurch sich bereits Kohärenzlängen im cm-Bereich ergeben.

Kontinuierlich emittierende Laser erreichen typischerweise spektrale Breiten in der Größenordnung von 1 MHz , sofern sie auf nur einem longitudinalen Mode des Laserresonators betrieben werden („single-mode laser“). Die entsprechenden Kohärenzlängen liegen bei einigen 10 m oder mehr. Auf der Längenskala eines typischen Experiments, z.B. eines Holographieaufbaus, ist das Licht damit vollständig kohärent. Es sei bemerkt, dass man durch Anwendung ausfeilterter Techniken bereits Laserlicht mit einer spektralen Breite deutlich unterhalb von 1 Hz realisieren konnte. Die Weglängendifferenz in einem Michelson-Interferometer könnte in diesem Fall bis zu $100\,000 \text{ km}$ betragen, ohne dass die Interferenz verschwindet.

4.1.3 Räumliche Kohärenz

Zur Beschreibung der räumlichen Kohärenz wird das Lichtfeld $E(\mathbf{r}, t)$ zu einem festen Zeitpunkt t an zwei verschiedenen Orten \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 betrachtet, die gleich weit von der Lichtquelle entfernt sind. Eine ideal punktförmige Lichtquelle weist – völlig unabhängig von ihren zeitlichen Kohärenzeigenschaften – eine perfekte räumliche Kohärenz auf, denn das Licht (eine Elementarwelle in Huygenschen Sinne) erreicht die beiden Orte \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 immer mit genau der gleichen Phase. Für eine Lichtquelle mit einer endlichen Aus-

dehnung d findet man an zwei Orten, die beide die gleiche Entfernung L von der Quelle haben, dann Kohärenz, wenn der Abstand der beiden Punkte voneinander die Größe

$$l_{c,\perp} = \lambda \frac{L}{2d} \quad (4.5)$$

nicht überschreitet, die auch als *transversale Kohärenzlänge* bezeichnet wird.

Die offensichtliche Tatsache, dass eine Lichtquelle eine hohe räumliche, d.h. transversale Kohärenz liefern kann, wenn sie nur klein genug ist, hat für Interferenzexperimente mit klassischen Lichtquellen zentrale Bedeutung. Durch einen einfachen engen Spalt erreicht man hier mit „weißem“ Licht eine hohe räumliche Kohärenz und kann Interferenzerscheinungen z.B. in einem Young-Doppelspaltversuch beobachten.

Für Laserlicht spielt der Begriff der räumlichen Kohärenz keine große Rolle, denn Laserlicht ist praktisch beliebig räumlich kohärent, sofern der Laserbetrieb auf nur einen transversalen Resonatormode beschränkt ist (transversal „single-mode“).

Fassen wir kurz zusammen: Die zeitliche Kohärenz wird durch die endliche Bandbreite der Lichtquelle bestimmt, während die räumliche Kohärenz mit der endlichen Ausdehnung der Lichtquelle zusammenhängt. Laserlicht weist im Gegensatz zu klassischen Lichtquellen eine sehr hohe zeitliche und räumliche Kohärenz auf, sodass man es in vielen Fällen als perfekt kohärent ansehen kann.

4.2 Ausbreitung von Laserlicht: der Gauß-Strahl

Das von einer Laserquelle emittierte Licht lässt sich wegen seiner starken Bündelung oft als Strahl im Sinn der geometrischen Optik beschreiben. Bei genauerer Betrachtung hat der Laserstrahl aber eine endliche Ausdehnung und ist eigentlich eine Lichtwelle. Wie man eine solche „strahlartige“ Welle beschreibt und welche Konsequenzen sich daraus für die Ausbreitung von Laserlicht ergeben, wollen wir in diesem Abschnitt diskutieren.

Ausgangspunkt für unsere Betrachtungen ist die Wellengleichung

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \frac{1}{c^2} \cdot \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2}, \quad (4.6)$$

wie sie sich direkt aus den Maxwell-Gleichungen im Vakuum ergibt. Hier bezeichnet ∇^2 den Laplace-Operator, der in kartesischen Koordinaten die Darstellung $\nabla^2 = \partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2 + \partial^2/\partial z^2$ besitzt. Wir interessieren uns hier nur für ein monochromatisches Laserfeld der Frequenz ω , und wir wollen uns, ohne auf Effekte der Lichtpolarisation einzugehen, auf eine skalare Theorie beschränken, die für unseren Zweck völlig ausreicht. Daher machen wir den Ansatz

$$E(\mathbf{r}, t) = \text{Re}(\hat{E}(\mathbf{r}) \cdot e^{-i\omega t}), \quad (4.7)$$

wobei wir uns der vorteilhaften komplexen Schreibweise für das elektrische Feld mit der komplexen Amplitude \hat{E} bedienen. So ergibt sich die zeitunabhängige skalare Wellengleichung

$$\nabla^2 \hat{E} + k^2 \hat{E} = 0, \quad (4.8)$$

die als *Helmholtz-Gleichung* bezeichnet wird. Die Größe $k = \omega/c = 2\pi/\lambda$ ist dabei die sog. Wellenzahl.

Zwei mögliche Lösungen von (4.8) sind in der Physik wohlbekannt: die ebene Welle $e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}}$ und die Kugelwelle $r^{-1}e^{ikr}$. Beide Wellenformen sind allerdings unendlich ausgedehnt und daher zur Beschreibung einer „strahlartigen“ Welle ungeeignet.

Wir nehmen jetzt an, dass sich der zu beschreibende Lichtstrahl in z -Richtung ausbreitet und dass er dabei nicht zu stark von einer ebenen Welle abweicht. Daher machen wir durch Abseparierung eines ebenen Wellenanteils e^{ikz} den Ansatz

$$\hat{E}(\mathbf{r}) = \psi(\mathbf{r}) e^{ikz}. \quad (4.9)$$

Die Größe $\psi(\mathbf{r})$ beschreibt hier eine Modifikation der ebenen Welle. Mit diesem Ansatz gehen wir in die skalare Wellengleichung (4.8). Dabei vernachlässigen wir den Term $\partial^2\psi/\partial z^2$, da ja die Ortsabhängigkeit im Wesentlichen in dem Faktor e^{ikz} enthalten sein soll, sodass ψ nur noch schwach von z abhängt. So ergibt sich für ψ die folgende Differentialgleichung, die *paraxiale Wellengleichung* genannt wird:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) \psi = -2ik \frac{\partial}{\partial z} \psi. \quad (4.10)$$

Als einfachste Lösung findet man den *Gauß-Strahl*

$$\psi(\mathbf{r}) = A \frac{w_0}{w(z)} e^{-\rho^2/w^2(z)} \cdot e^{ik\rho^2/2R(z)} \cdot e^{-i\phi(z)}, \quad (4.11)$$

wobei $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$ die Entfernung von der Strahlachse angibt. Diese Lösung lässt sich als Produkt von drei Termen anschaulich interpretieren:

(i) Der erste Term beschreibt das transversale Strahlprofil, für das man die Form einer Gauß-Glockenkurve findet. Der z -abhängige Strahlradius (bezogen auf die Abnahme der Feldstärke auf den e -ten Teil) ist dabei durch

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + (z/z_0)^2} \quad (4.12)$$

gegeben. Der kleinste Strahlradius w_0 , der bei $z = 0$ auftritt, wird als *Strahltaille* bezeichnet. Die Größe

$$z_0 = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (4.13)$$

wird *Rayleigh-Länge* genannt; ihre anschauliche Bedeutung wird etwas weiter unten deutlich werden. Der Vorfaktor $w_0/w(z)$ berücksichtigt, dass der Strahl eine konstante, d.h. z -unabhängige Lichtleistung transportiert. Bei zunehmendem Strahlradius muss die Feldstärke wegen der Energieerhaltung natürlich abnehmen. Für die Intensität $I = \frac{1}{2}c\epsilon_0|\psi|^2$ des Gauß-Strahls erhält man

$$I(\rho, z) = \frac{c\epsilon_0}{2} |A|^2 \frac{w_0^2}{w^2(z)} e^{-2\rho^2/w^2(z)}. \quad (4.14)$$

(ii) Der zweite Term ist ein Phasenfaktor, der eine Krümmung der Wellenfronten mit dem Radius

$$R(z) = z + \frac{z_0^2}{z} \quad (4.15)$$

beschreibt. Die Welle ähnelt also in dieser Beziehung einer Kugelwelle mit dem entsprechenden Krümmungsradius $R(z)$.

(iii) Der dritte Term ist ein weiterer Phasenfaktor, für den man

$$\phi(z) = \arctan(z/z_0) \quad (4.16)$$

findet. Auf eine Diskussion dieser Phase, die für die genaue Resonanzlage in einem optischen Resonator durchaus eine wichtige Rolle spielt, können wir hier verzichten.

Der Gauß-Strahl ist in Abb. 4.3 illustriert. Seine Form ist bei gegebener Lichtwellenlänge λ durch nur eine Größe vollständig charakterisiert: durch die Strahlaille w_0 oder alternativ auch durch die Rayleigh-Länge z_0 .

Betrachten wir den Gauß-Strahl nun in drei Grenz- bzw. Spezialfällen:

1. Innerhalb des Rayleigh-Bereichs ($z \ll z_0$) erhält man für die Krümmung der Wellenfronten aus (4.15) näherungsweise $R(z) = z_0^2/z \gg z_0$. In der Nähe der Strahlaille kann man den Gauß-Strahl daher als nahezu ebene Welle mit einer transversalen Ausdehnung von w_0 ansehen.
2. Für $z = z_0$ findet man mit $R(z_0) = 2z_0$ die maximale Wellenfrontkrümmung. Der Strahlradius beträgt hier $w(z_0) = \sqrt{2}w_0$.

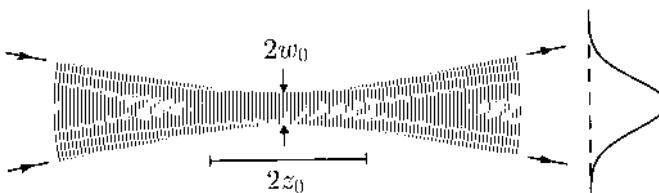


Abb. 4.3. Illustration eines Gauß-Strahls. Dargestellt sind die Phasenfronten innerhalb des Strahlradius $w(z)$ sowie ein typisches Intensitätsprofil

3. Weit außerhalb des Rayleigh-Bereichs ($z \gg z_0$) ergibt sich aus (4.15) die Näherung $R(z) = z$. Der Strahl entspricht in der Nähe der Strahlachse einer Kugelwelle mit Zentrum bei $z = 0$. Für den Strahlradius $w(z)$ erhält man in diesem Fall aus (4.12) die Näherung $w(z) = w_0 \cdot z/z_0$. Der Strahlradius wächst also außerhalb des Rayleigh-Bereichs proportional zur Entfernung an, d.h. er weist eine konstante Divergenz auf, die sich durch den Divergenzwinkel

$$\theta \approx \frac{w(z)}{z} \approx \frac{w_0}{z_0} = \frac{\lambda}{\pi w_0} \quad (4.17)$$

beschreiben lässt.

Dieses Resultat für $z \gg z_0$ ist der Divergenz sehr ähnlich, die man im Fernfeld bei der Beugung einer ebenen Welle an einer kreisrunden Öffnung erhält. Je kleiner der Radius r dieser Blende ist, desto stärker treten selbstverständlich Beugungseffekte auf. Oft findet man hierfür in Lehrbüchern die Definition eines Fernfelddivergenzwinkels $\theta = 0.61 \lambda/r$. Der Vergleich mit (4.17) zeigt, dass die Divergenz eines Gauß-Strahls mit Taille w_0 von gleicher Größenordnung ist wie die resultierende Divergenz bei der Beugung einer ebenen Welle an einer Blende mit Radius $r \approx w_0$. Die Aufweitung des Gauß-Strahls im Fernfeld ist offensichtlich ein Beugungseffekt. Tatsächlich ist das Gauß-Strahl-Profil sogar ein Optimalfall, denn es ergibt bei gegebenem Strahldurchmesser bei $z = 0$ die geringste Divergenz im Fernfeld.

Diese Resultate haben wichtige Konsequenzen für die Ausbreitung eines Laserstrahls, wie wir an zwei Beispielen verdeutlichen wollen: Betrachten wir z.B. den Strahl eines HeNe-Lasers ($\lambda = 633 \text{ nm}$), der aus dem Laserresonator mit einem Radius von 0,5 mm austritt. Für die Rayleigh-Länge erhalten wir damit die Abschätzung² $z_0 \approx 1,25 \text{ m}$. Wenn wir uns dafür interessieren, wie groß der Laserstrahl nach 100 m geworden ist, befinden wir uns also weit außerhalb des Rayleigh-Bereichs und erhalten für die Divergenz nach (4.17) den Wert $\theta \approx 0,4 \text{ mrad}$. Der Strahl weitet sich also auf einer Distanz von 100 m auf einen Radius von ca. 4 cm auf.

Diese Ergebnis ist auch umkehrbar: Ein Strahl eines HeNe-Lasers, der in einem Abstand von 100 m auf einen Radius $w_0 = 0,5 \text{ mm}$ fokussiert werden soll, muss am Ausgangsort einen Radius von 4 cm haben. Möchte man zur exakten Laserbearbeitung eines Materials einen sehr kleinen Fokus erzeugen (z.B. $w_0 = 10 \mu\text{m}$ mit einem Nd:YAG-Laser, $\lambda = 1064 \text{ nm}$) erfordert dies eine Konvergenz des einlaufenden Strahls mit dem Winkel $\theta = 34 \text{ mrad}$. Befindet sich die fokussierende Optik im Abstand von 20 cm vom Fokus, muss der Strahl dort bereits einen Radius von 6,8 mm haben.

Die Lösung der paraxialen Wellengleichung, die wir hier diskutiert haben, ist nicht die einzige Lösung, sondern nur der einfachste Fall (der sog. Grundmode) eines vollständigen Lösungssystems, ganz ähnlich wie der gaußförmige

² Es handelt sich hier um eine untere Abschätzung, da die Strahltaille irgendwo im Laserresonator (typische Länge: einige 10 cm) liegt.

quantenmechanische Grundzustand in einem harmonischen Oszillatorenpotential. Die komplizierteren Lösungen, die sog. höheren transversalen Moden, zeigen in ihren transversalen Feldverteilungen Knotenlinien, deren Anzahl von der Ordnung des Modes abhängt. Dies wird in fast jedem Buch zur Laserphysik diskutiert. Im Allgemeinen sind solche höheren Moden aber unerwünscht für den Laserbetrieb und lassen sich oft auch leicht eliminieren. Im hier betrachteten Laserbetrieb im transversalen Grundmode, der unseren Gauß-Strahl produziert, erreicht man eine vollständige räumliche Kohärenz und auch die beste Fokussierbarkeit.

4.3 Resonante Wechselwirkung von Laserlicht und Materie

Für die Laserphysik ist die resonante Wechselwirkung von Licht und Materie von grundlegender Bedeutung. Wir wollen hier auf elementare Weise beschreiben, was mit monochromatischem Laserlicht geschieht, wenn es durch ein Medium tritt, mit dem es resonant wechselwirkt. Die betrachtete Situation ist in Abb. 4.4 illustriert. Es ist wohlbekannt, dass das Licht i. Allg. auf zwei verschiedene Weisen beeinflusst wird: Es kann eine frequenzabhängige Abschwächung sowie eine frequenzabhängige Phasenverschiebung erfahren. Die entsprechende Absorptions- und Dispersionskurve wollen wir im Folgenden in einem einfachen Modell berechnen.

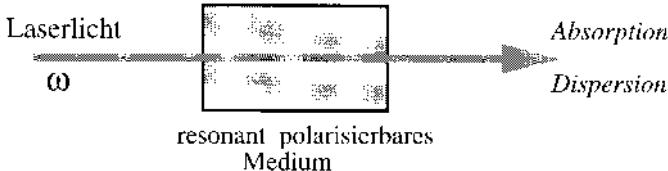


Abb. 4.4. Illustration der hier betrachteten Situation: Ein Laserstrahl tritt durch das Medium, in dem es mit resonant polarisierbaren Atomen (oder Molekülen) wechselwirkt

4.3.1 Elektromagnetische Welle im polarisierbaren Medium

Die Ausbreitung der Lichtwelle im polarisierbaren Medium beschreibt die inhomogene Wellengleichung

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2}, \quad (4.18)$$

die sich aus den Maxwell-Gleichungen für ein elektrisch neutrales und nicht-magnetisches Medium ergibt. Die Größe \mathbf{P} steht dabei für die makroskopische Polarisation des Mediums, d.h. die Dichte des elektrischen Dipolmoments.

Im Fall eines optisch linearen Mediums ergibt sich die Amplitude der Polarisierung proportional zur Amplitude der Feldstärke; darüberhinaus müssen wir aber eine mögliche Phasenverschiebung beachten. Man benutzt daher üblicherweise die komplexe Schreibweise $E(t) = \text{Re}(\hat{E}e^{-i\omega t})$ und $P(t) = \text{Re}(\hat{P}e^{-i\omega t})$ für die oszillierenden Größen elektrisches Feld und Polarisierung und führt eine komplexe Proportionalitätskonstante ein:

$$\hat{P} = \epsilon_0 \chi \hat{E}. \quad (4.19)$$

Die so definierte Größe χ wird als *komplexe Suszeptibilität* bezeichnet. Es sei noch darauf hingewiesen, dass wir uns hier auf ein isotropes Medium beschränken, in dem χ eine skalare Größe ist. In einem doppelbrechenden Medium z.B. ist χ ein Tensor zweiter Stufe, der den Feldvektor mit dem Polarisationsvektor verbindet.

Mit diesem Ansatz reduziert sich die inhomogene Wellengleichung in skalarer Form auf

$$\nabla^2 \hat{E} + (1 + \chi) \frac{\omega^2}{c^2} \hat{E} = 0. \quad (4.20)$$

Beim Vergleich mit der im vorangegangen Abschnitt diskutierten Helmholtz-Gleichung (4.8) sieht man leicht, dass man den Einfluss des polarisierbaren Mediums auf die Wellenausbreitung dadurch berücksichtigen kann, dass man die Lichtgeschwindigkeit c im Vakuum durch c/n_c mit dem komplexen Brechungsindex $n_c = \sqrt{1 + \chi}$ ersetzt.

Als einfachste Lösung der Wellengleichung betrachten wir nun die wohlbekannte ebene Welle:

$$\begin{aligned} E &= \frac{1}{2} \hat{E} \exp(-i\omega t + i n_c k z) + \text{c.c.} \\ &= \frac{1}{2} \hat{E} \exp(-i\omega t + i n k z) \exp(-\frac{\alpha}{2} z) + \text{c.c.}, \end{aligned} \quad (4.21)$$

wobei $k = \omega/c$ wieder die Wellenzahl im Vakuum ist. Hier sehen wir, dass das Medium die Welle auf zweierlei Weise beeinflusst: Die Phasengeschwindigkeit ist nun $\omega/kn = c/n$ mit dem reellen Brechungsindex $n = \text{Re}(n_c)$, und es tritt eine zusätzliche Dämpfung auf, die durch den Absorptionskoeffizienten $\alpha = 2k\text{Im}(n_c)$ beschrieben wird. Die Intensität der Welle nimmt im Medium exponentiell ($\propto e^{-\alpha z}$) ab, wie es als *Beer-Gesetz* bekannt ist.

In dem oft vorliegenden Fall $|n_c| \approx 1$ gilt die Näherung $\sqrt{1 + \chi} \approx 1 + \chi/2$, und es ergeben sich die folgenden wichtigen Beziehungen, die die Dispersion und die Absorption mit dem Realteil und dem Imaginärteil der Suszeptibilität verbinden:

$$n = 1 + \frac{1}{2} \text{Re}(\chi) \quad \text{Brechungsindex}, \quad (4.22)$$

$$\alpha = k\text{Im}(\chi) \quad \text{Absorptionskoeffizient}. \quad (4.23)$$

4.3.2 Klassisches Oszillatormodell: Absorption und Dispersion

Die eben betrachtete Suszeptibilität χ ist eine makroskopische Größe, die die Polarisierbarkeit des Mediums beschreibt. Wir wollen χ nun in einer einfachen mikroskopischen Theorie berechnen. Dazu bedienen wir uns nun des sog. Lorentz-Modells und betrachten die durch das Licht angeregten Atome als klassische Oszillatoren, bei denen ein Hüllelektron wie mit einer Feder elastisch an den Rumpf gebunden ist. Wenn man nun z.B. aus einer spektroskopischen Messung eine bestimmte Resonanzlinie kennt, ergibt sich aus deren Frequenz $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ unmittelbar die zugehörige Federkonstante $\kappa = m_e\omega_0^2$, wobei m_e die Masse des Elektrons bezeichnet.

Das elektrische Feld des Lichts führt zu einer erzwungenen Schwingung des Elektrons, die durch die Differentialgleichung

$$\ddot{x} + \Gamma\dot{x} + \omega_0^2 x = -\frac{e}{m_e} \hat{E} e^{-i\omega t} \quad (4.24)$$

beschrieben wird. Die Dämpfungskonstante Γ berücksichtigt dabei, dass das oszillierende Elektron durch Strahlung Energie verliert. Aus Larmors Lehrbuchformel für die abgestrahlte Leistung einer beschleunigten Ladung ergibt sich

$$\Gamma = \frac{e^2 \omega_0^2}{6\pi\epsilon_0 m_e c^3}. \quad (4.25)$$

Mit dem Ansatz $x = \hat{x}e^{-i\omega t}$ erhält man in der Umgebung einer optischen Resonanz ($|\omega - \omega_0| \ll \omega_0$) die Lösung

$$\hat{x} = \frac{e}{m_e \omega_0} \frac{1}{\omega - \omega_0 + i\Gamma/2} \hat{E}; \quad (4.26)$$

wir haben hier angenommen, dass eine schwache Dämpfung $\Gamma \ll \omega_0$ vorliegt. Dies ist für einen optischen Übergang immer eine sehr gute Näherung (typisch: $\Gamma/\omega_0 \sim 10^{-8}$).

Mit dem so berechneten induzierten Dipolmoment $-e\hat{x}$ des atomaren Oszillators und der Dichte N der Atome im Medium erhält man nun die makroskopische Polarisierung

$$\begin{aligned} \hat{P} &= N \cdot (-e\hat{x}) \\ &= -\frac{Ne^2}{m_e \omega_0} \frac{1}{\omega - \omega_0 + i\Gamma/2} \hat{E}. \end{aligned} \quad (4.27)$$

Aus der Definition der komplexen Suszeptibilität gemäß (4.19) ($\hat{P} = \epsilon_0 \hat{E}$) und unter Verwendung von (4.22), (4.23) und (4.25) können wir nun den Absorptionskoeffizienten und den Brechungsindex des Mediums in der folgenden Form schreiben:

$$\alpha = \alpha_0 \cdot \frac{\Gamma^2/4}{(\omega - \omega_0)^2 + \Gamma^2/4}, \quad (4.28)$$

$$n - 1 = \frac{\alpha_0}{4k} \cdot \frac{(\omega_0 - \omega)\Gamma}{(\omega - \omega_0)^2 + \Gamma^2/4}; \quad (4.29)$$

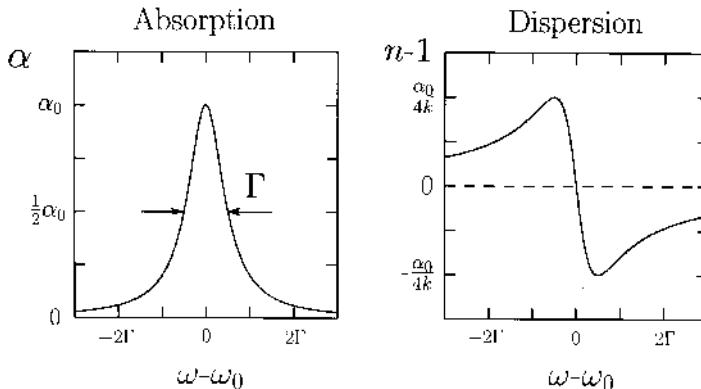


Abb. 4.5. Resonanzverhalten von Absorptionskoeffizient und Brechungsindex

dabei bezeichnet

$$\alpha_0 = \frac{3}{2\pi} N \lambda^2 \quad (4.30)$$

den Absorptionskoeffizienten auf Resonanz ($\omega = \omega_0$). Oft erweist es sich auch als nützlich, den Wirkungsquerschnitt σ eines Atoms für die resonante Absorption zu betrachten:

$$\sigma = \frac{\alpha_0}{N} = \frac{3}{2\pi} \lambda^2. \quad (4.31)$$

Das Resonanzverhalten von Absorptionskoeffizient und Brechungsindex ist in Abb. 4.5 dargestellt. Die Absorptionskurve entspricht einer Lorentz-Kurve mit der Halbwertsbreite Γ . Die Dispersionkurve zeigt einen Null-durchgang auf Resonanz; für $\omega < \omega_0$ ist $n - 1$ positiv, im umgekehrten Fall negativ. In der direkten Umgebung der Resonanz ($|\omega - \omega_0| < \Gamma/2$) fällt der Brechungsindex mit steigender Frequenz, d.h. es liegt die sog. anomale Dispersion vor. In hinreichender Entfernung von der Resonanz steigt der Brechungsindex mit der Frequenz an, was als normales Dipersionsverhalten bezeichnet wird.

4.3.3 Verbindung zur Quantenmechanik und Lasertheorie

Selbstverständlich ist die klassische Theorie des vorangegangenen Abschnitts nicht dazu geeignet, die Vorgänge in einem Atom vollständig und quantitativ korrekt zu beschreiben. Hierfür benötigen wir ja die Quantenmechanik. Wir haben die klassische Theorie aber dennoch verwendet, weil sie für die Absorption und Dispersion von Licht gute und anschauliche Ergebnisse liefert, die teilweise sogar auch quantitativ völlig korrekt sind (z.B. (4.30) und (4.31)). Die klassischen Formeln lassen sich auch auf einfache Weise „flicken“, sodass

man die quantenmechanisch richtigen Ergebnisse erhält. Sie sind daher auch eine nützliche Grundlage für die Lasertheorie.

In der Quantenmechanik führen wir die betrachtete optische Resonanzlinie auf einen Übergang zwischen zwei Energieniveaus im Abstand $\hbar\omega_0$ zurück. Die Resonanzabsorption interpretieren wir als ein Folge von Anregungen (elementare Absorptionsprozesse) und Zerfällen (spontanen Emissionsprozesse), bei denen jeweils ein Photon ein Atom in den angeregten Zustand befördert und dieser darauf unter Aussendung eines Photons wieder zerfällt.

Durch die beiden einfachen Substitutionen

$$\Gamma \longrightarrow f\Gamma, \quad (4.32)$$

$$N \longrightarrow \frac{1}{3} \left(\frac{g_2}{g_1} N_1 - N_2 \right) \quad (4.33)$$

erhalten wir aus den klassischen Formeln die quantenmechanischen Ergebnisse, die im Fall nicht zu hoher Lichtintensitäten gelten.

Die Größe f in (4.32) wird als *Oszillatorstärke* bezeichnet. Sie kann maximal einen ganzzahligen Wert annehmen, der der Zahl der am Übergang beteiligten Elektronen entspricht. Dies lässt sich am besten an einem Beispiel verdeutlichen: Im Natriumatom findet man eine starke Resonanzlinie bei $\lambda = 589$ nm, die für das orange Licht von Natriumdampflampen (Straßenlaternen, Beleuchtung des Heidelberger Schlosses) verantwortlich ist. Die klassische Formel (4.25) liefert eine Dämpfungsrate $\Gamma = 1/15,6$ ns. Das quantenmechanische Ergebnis, also die tatsächliche Zerfallsrate des angeregten Zustands, ist $f\Gamma = 1/16,1$ ns. Die Oszillatorstärke ist also $f = 0,97$, verblüffend nahe an dem Maximalwert von 1 (ein Hüllenelektron ist hier am Übergang beteiligt). In atomaren Oszillatoren findet man tatsächlich sehr häufig einen dominanten Resonanzübergang, der sehr nahe am klassischen Oszillator liegt, aber auch viele andere Übergänge, die wesentlich schwächer sind. Oft sind gerade relativ schwache Übergänge mit entsprechend langer Lebensdauer der angeregten Zustandsbesetzung für die Realisierung von Lasern interessant.

In (4.33) bezeichnen N_1 und N_2 die Besetzungsdichten des unteren bzw. oberen atomaren Zustands, und g_1 und g_2 stehen für die entsprechenden Entartungsgrade. Hieraus ergeben sich direkt sehr wichtige Konsequenzen:

1. Wenn keines der beiden Niveaus besetzt ist, kommt es zu keiner Wechselwirkung.
2. Wenn die beiden Niveaus unter Berücksichtigung ihrer Entartung gleich besetzt sind ($N_1/g_1 = N_2/g_2$), verschwindet die Wechselwirkung.
3. Wenn das untere Niveau stärker besetzt ist als das obere ($N_1/g_1 > N_2/g_2$, thermischer Gleichgewichtsfall), verhalten sich Absorption und Dispersion normal, d.h. wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.
4. Ist das obere Niveau stärker besetzt ($N_2/g_2 = N_1/g_1$, d.h. Besetzungsinversion), kehren Absorption und Dispersion ihr Vorzeichen um.

Der letztgenannte Punkt ist für die Laserphysik von zentraler Bedeutung: Für $N_2/g_2 - N_1/g_1 > 0$ wirkt das Medium insgesamt lichtverstärkend! Wir können damit die Nettoabsorption bzw. Nettoverstärkung des Mediums als Resultat von zwei konkurrierenden Prozessen verstehen: Der zur Grundzustandsbesetzung N_1 proportionale Anteil ist eine Folge von elementaren Absorptionsprozessen, wohingegen der zur Besetzung des angeregten Zustands N_2 proportionale Anteil sich als Resultat von *induzierten Emissionsprozessen* interpretieren lässt. Da beide Prozesse sich sonst nur durch das Vorzeichen unterscheiden, kann man die induzierte Emission als direkten Umkehrprozess der Absorption ansehen.

Das einfache Oszillatormodell ermöglicht es, die Prozesse Absorption, induzierte Emission und spontane Emission auf mikroskopischer Ebene zu deuten und stellt damit auch eine wichtige Grundlage für die Lasertheorie dar.

Literatur

1. Haken H (1989) Licht und Materie I. BI-Wiss.-Verl. Mannheim
2. Haken H (1994) Licht und Materie II. BI-Wiss.-Verl. Mannheim
3. Hecht E (1974) Optics. Addison-Wesley Bonn
4. Lange W (1994) Einführung in die Laserphysik. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt
5. Lauterborn W, Kurz T und Wiesenfeldt M (1993) Kohärente Optik. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
6. Milonni PW and Eberly JH (1988) Lasers. Wiley, New York
7. Siegman A (1986) Lasers. Univ. Sci. Books, Mill Valley

5 Nichtlineare Optik und kurze Laserpulse

F.X. Kärtner

Dieser Abschnitt soll einen Einblick in die lineare und nichtlineare Ausbreitung von Laserstrahlung in Materie geben. Im Speziellen werden die wichtigsten Prozesse der nichtlinearen Optik diskutiert. Dies erlaubt uns dann, die Erzeugung kurzer Laserpulse mit Hilfe nichtlinearer optischer Effekte näher zu betrachten. Kurze Laserpulse sind notwendig, um große nichtlineare optische Effekte bei schon relativ niedrigen mittleren Leistungen zu erzielen. Daraus resultieren wichtige Anwendungen in den Naturwissenschaften, der Technik und der Medizin, z.B. in der Chirurgie das Schneiden von Gewebe. Andererseits lassen sich kurze Laserpulse dazu verwenden, den Verlauf extrem schneller physikalischer, chemischer oder biologischer Prozesse, welche sich in wenigen Nano-, Piko- oder Femtosekunden ereignen, zu verstehen und quantitativ zu erfassen. Wichtige Beispiele dafür sind die Aufklärung der Reaktionspfade bei der Photosynthese [11] und die Ladungsträgerdynamik in Halbleitern [22].

5.1 Ausbreitung elektromagnetischer Wellen

Wir betrachten das elektrische Feld einer ebenen, elektromagnetischen Welle mit der Frequenz ν bzw. Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu$, welche sich in einem homogenen Medium in z -Richtung ausbreitet und entlang der x -Achse polarisiert ist:

$$\mathbf{E}(z, t) = E(z, t) \mathbf{e}_x = \hat{E} \cos(kz - \omega t + \varphi) \mathbf{e}_x. \quad (5.1)$$

Hier bedeutet \hat{E} die Amplitude, φ die Phase und k die Wellenzahl der Welle. Die Wellenzahl ist gegeben durch $k = \omega/c = \omega n/c_0$, wobei c die Lichtgeschwindigkeit der Welle im Medium ist und c_0 die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum sein soll. n ist dann der Brechungsindex des Mediums, d.h. das Verhältnis zwischen der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und der Lichtgeschwindigkeit im Medium. Abbildung 5.1 zeigt die Ebenen konstanter Phase dieser Welle. Die Geschwindigkeit, mit der sich diese Ebenen nach rechts bewegen, nennt man Phasengeschwindigkeit v_p . In unserem Beispiel findet man $v_p = c = c_0/n$.

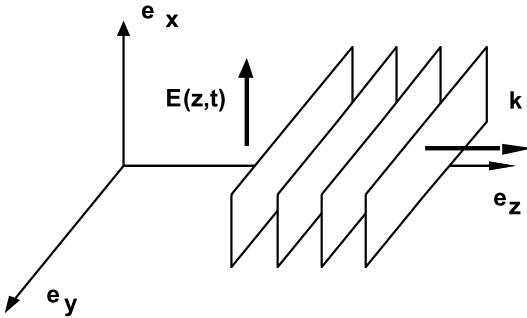


Abb. 5.1. Ausbreitung der Ebenen konstanter Phase einer ebenen, monofrequenten, in x -Richtung polarisierten elektromagnetischen Welle, die sich entlang der z -Achse ausbreitet

5.2 Lineare Wellenausbreitung

5.2.1 Dispersion

Im Allgemeinen ist der Brechungsindex nicht konstant sondern eine Funktion der Frequenz. Dies führt dazu, dass ebene Wellen mit verschiedener Frequenz eine unterschiedliche Phasengeschwindigkeit besitzen. Wichtig wird dies bei der Ausbreitung von optischen Pulsen. Pulse setzen sich aus einer Summe von sehr vielen ebenen Wellen mit verschiedenen Frequenzen zusammen, die um eine Trägerfrequenz ω_0 zentriert sind. Im Grenzfall eines isolierten Pulses liegen die Frequenzen dicht, und die Summe geht in ein Integral über

$$E(z, t) = \sum_i \hat{E}(\omega_i) \cos(k(\omega_i)z - \omega_i t + \varphi_i) \quad (5.2)$$

$$\sim \int_0^\infty \hat{E}(\omega) \cos(k(\omega)z - \omega t + \varphi(\omega)) d\omega. \quad (5.3)$$

$\hat{E}(\omega)$ nennt man dann das Amplitudenspektrum des Pulses im Frequenzbereich (Abb. 5.2), welches durch Fourier-Transformation aus der Zeitfunktion berechnet werden kann. Am Ort konstruktiver Interferenz aller Wellen, d.h. an dem Ort, an welchem die Wellenberge aller Wellen übereinanderliegen, entsteht das Pulszentrum (s. Abb. 5.2). Da die Wellenzahlen der verschiedenen Wellen voneinander abweichen, laufen sie mit zunehmender Distanz vom Pulszentrum sehr schnell außer Phase, d.h. es tritt destruktive Interferenz auf, was das Feld außerhalb des Pulszentrums auslöscht (s. Abb. 5.2). Daraus folgt unmittelbar, dass ein kurzer Puls ein breites Spektrum haben muss. Es gilt

$$\Delta t \cdot \Delta \omega \geq 0.5. \quad (5.4)$$

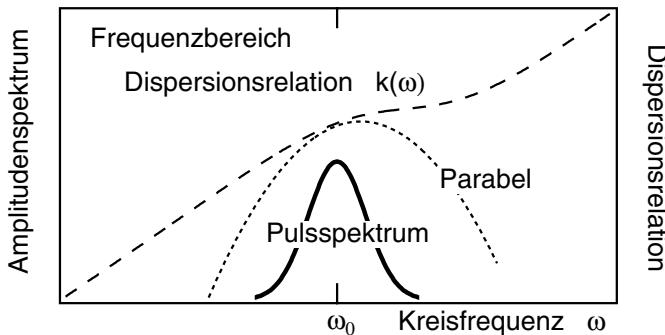


Abb. 5.2. In der Fourier-Darstellung eines Pulses wird die Amplitude der Teilwellen als Funktion der Frequenz aufgetragen. Skizziert ist das Amplitudenspektrum des Pulses und darüber die Dispersionrelation als Funktion der Kreisfrequenz. In der Nähe des Pulszentrums kann die Dispersionrelation durch eine Parabel genähert werden. Die Krümmung der Parabel bestimmt die Dispersion oder Pulsverbreiterung während der Pulsausbreitung

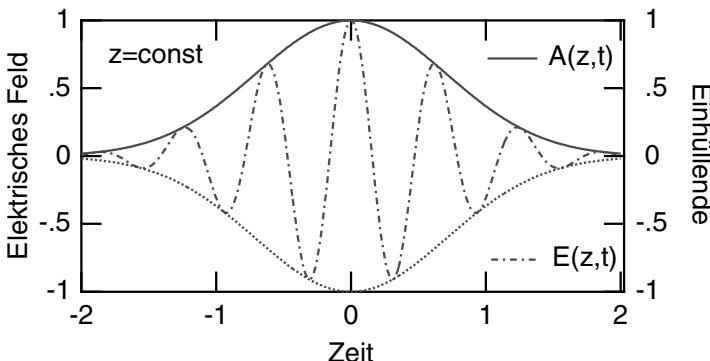


Abb. 5.3. Darstellung des elektromagnetischen Pulses im Zeitbereich. Ein elektromagnetischer Puls kann in ein Produkt aus einer hochfrequenten Trägerschwingung und der Pulseinhüllenden $A(z, t)$ zerlegt werden

Bei der Ausbreitung der Wellen kommt es aufgrund der Abhängigkeit der Wellenzahl von der Frequenz zu einer zusätzlichen Phasenverschiebung zwischen den einzelnen Wellen (s. Abb. 5.2). Die Abhängigkeit der Wellenzahl von der Frequenz $k(\omega)$ nennt man Dispersionsrelation. Ist der Zusammenhang zwischen Wellenzahl und Frequenz linear, d.h. ist der Brechungsindex konstant, so bewegen sich für alle Teilwellen die Wellenberge bzw. Wellentäler mit der selben Phasengeschwindigkeit, und der Puls erfährt eine zeitliche Verschiebung ohne Verformung der Pulseinhüllenden (Abb. 5.3). Ist dagegen die Dispersionsrelation nichtlinear, wie in Abb. 5.2 dargestellt, so kommt es zu einer Verformung des Pulses, und das Maximum der Pulseinhüllenden A breitet sich mit einer von der Phasengeschwindigkeit v_p verschiedenen

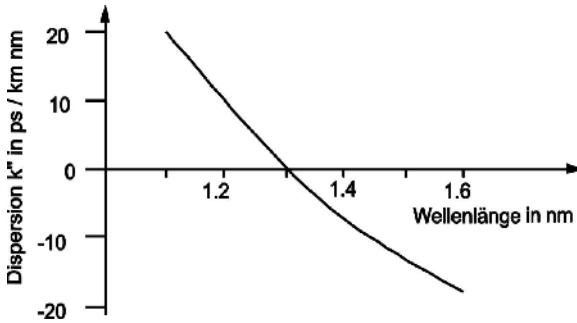


Abb. 5.4. Dispersionsverlauf in einer gewöhnlichen Einmodenglasfaser (geschmolzener Quarz) in gebräuchlichen Einheiten

Geschwindigkeit aus. Man spricht von der Gruppengeschwindigkeit v_g , die jetzt von der Trägerfrequenz ω_0 des Pulses abhängt. Die Gruppengeschwindigkeit ist durch den Kehrwert der Steigung der Dispersionsrelation bei der Trägerfrequenz gegeben:

$$v_g = \left. \left(\frac{\partial k}{\partial \omega} \right)^{-1} \right|_{\omega_0}. \quad (5.5)$$

Im Gegensatz dazu ist die Phasengeschwindigkeit durch das Verhältnis zwischen Frequenz und Wellenzahl bestimmt.

Zerlegt man den Gesamtpuls in Teilpulse, so breitet sich das Maximum von jedem dieser Teilpulse mit einer anderen Geschwindigkeit aus, was zu einem Zerfließen des Pulses während der Ausbreitung führt. Wie schnell sich der Puls verbreitert, hängt von der Veränderung der Gruppengeschwindigkeit als Funktion der Frequenz ab, was durch die Krümmung k'' , der Dispersionsrelation bei der Trägerfrequenz bestimmt wird. Oft wird die Krümmung selbst als Dispersion bezeichnet.

Abbildung 5.4 zeigt die Dispersion in einer Glasfaser als Funktion der Wellenlänge. Die Einheit ps/(km · nm) bedeutet, dass sich die Maxima von zwei Teilimpulsen, welche in ihrer Zentralwellenlänge um 1 nm unterschiedlich sind, nach einer Distanz von 1 km in der Faser um 1 ps, d.h. 10^{-12} s, zeitlich voneinander entfernt haben. Positive Dispersion bedeutet, dass sich Wellenpakete mit hoher Trägerfrequenz langsamer bewegen als Wellenpakete mit niedriger Trägerfrequenz. Es gilt das Umgekehrte für negative Dispersion. Die meisten Materialien zeigen im Frequenzbereich, in dem sie transparent sind, positive Dispersion. Wir können der Abb. 5.4 entnehmen, dass es in Glasfasern Wellenlängen gibt, hier 1,3 µm, bei denen in erster Näherung keine Pulsverbreiterung auftritt. Dies kann z.B. in der optischen Kommunikation genutzt werden. Der Einfluss der Dispersion wird umso wichtiger, je kürzer der Puls ist, d.h. je breiter sein Spektrum ist.

5.2.2 Dämpfung und Verstärkung

Bisher haben wir die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen in verlustfreien Medien betrachtet. Die Welle kann aber auch gedämpft bzw. verstärkt werden. Dämpfung oder Verlust tritt auf, wenn die Frequenz der elektromagnetischen Welle die Atome, welche das Medium bilden, in angeregte Zustände überführen kann. Verstärkung oder Gewinn tritt auf, wenn sich das Medium schon in einem passenden angeregten Zustand befindet, d.h. die entsprechende Besetzung invertiert ist. Dann wird die Welle beim Durchlaufen des Mediums verstärkt. Meist ist die Frequenzabhängigkeit der Verstärkung g bzw. Dämpfung sehr gut durch eine Lorentz-Funktion beschrieben [23], welche bei der Frequenz Ω_0 zentriert ist (Abb. 5.5). Die Verstimmung, bei der die Verstärkung auf die Hälfte abgefallen ist, heißt *halbe Halbwertsbreite* Ω_g :

$$g(\omega) = \frac{g_0}{1 + \left(\frac{\omega - \Omega_0}{\Omega_g}\right)^2}. \quad (5.6)$$

Haben alle zur Verstärkung beitragenden Übergänge dieselbe Zentralfrequenz, so spricht man von einer homogen verbreiterten Linie. Tragen zur Verstärkung mehrere unabhängige Linien mit verschiedenen Zentralfrequenzen bei, so spricht man von inhomogenen verbreiterten Linien. Im Folgenden wollen wir immer homogen verbreiterte Linien annehmen.

Ist das Material, in dem sich der Puls ausbreitet, nicht invertiert, so tritt Absorption auf. Auch die Frequenzabhängigkeit der Absorption ist meistens durch ein Lorentz-Profil beschrieben.

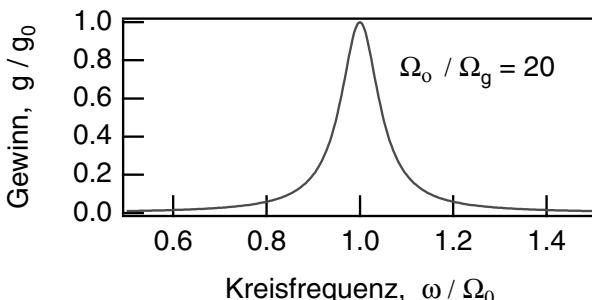


Abb. 5.5. Der optische Gewinn in verstärkenden Medien ist meist durch ein Lorentz-Profil beschrieben

5.3 Nichtlineare Wellenausbreitung

Bei der nichtlinearen werden im Gegensatz zur linearen Wellenausbreitung neue Frequenzen, d.h. neue Spektralanteile erzeugt. Bei der linearen Puls-

ausbreitung kommt es nur zu einer Verstärkung bzw. Dämpfung bereits vorhandener Spektralanteile oder zu unterschiedlichen Phasenverschiebungen zwischen den einzelnen Spektralanteilen. Ein elektrisches Feld induziert in einem Medium eine elektrische Polarisation. Dies ist eine Folge der elektrischen Kraft, welche das Feld auf die Ladungsverteilung in den Atomen auswirkt, aus denen sich das Medium zusammensetzt. Eine zeitlich veränderliche Polarisation strahlt selbst wieder eine elektromagnetische Welle ab. Die abgestrahlte Welle überlagert sich mit dem einfallenden Feld, wodurch sich die im Medium ausbreitende Welle verändert. Solche Prozesse wollen wir im Folgenden näher betrachten.

5.3.1 Die nichtlineare Suszeptibilität

Die Polarisation ist das Dipolmoment pro Volumeneinheit, d.h. $P = N_p$, wobei N die Anzahl der Atome pro Volumeneinheit und p das Disubpolmoment pro Atom ist.

Das Dipolmoment eines Dipols ist das Produkt aus Ladung e und dem Abstand zwischen der positiven und negativen Ladung ℓ , d.h. $p = e \cdot \ell$. Ist das angelegte Feld schwach, so erwarten wir, dass das in einem Atom induzierte Dipolmoment, welches infolge der Ladungstrennung im Feld entsteht, linear vom angelegten Feld abhängt (Abb. 5.6). Wird das Feld stärker, so wird die Polarisation im allgemeinen Fall nichtlinear vom angelegten Feld abhängen. Zur Klassifikation der verschiedenen nichtlinearen Prozesse ist es vorteilhaft, das Dipolmoment als Funktion des elektrischen Feldes in eine Potenzreihe zu zerlegen [2, 7]

$$p = e\ell = e \left\{ \alpha^{(1)} \left(\frac{E}{E_a} \right) + \alpha^{(2)} \left(\frac{E}{E_a} \right)^2 + \alpha^{(3)} \left(\frac{E}{E_a} \right)^3 + \dots \right\}. \quad (5.7)$$

Wir haben dabei das Feld auf eine typische intraatomare Feldstärke E_a normiert. Erreicht das angelegte Feld die Stärke des intraatomaren Feldes, so erwarten wir ein stark nichtlineares Dipolmoment, d.h. die erzeugten Ladungsverschiebungen infolge der verschiedenen Ordnungen sind gleich groß und von der Größenordnung des atomaren Durchmessers $\alpha^{(i)} = d_a = 10^{-10} \text{ m}$. Für

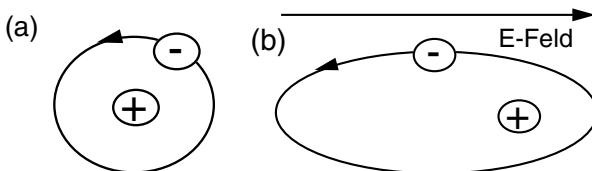


Abb. 5.6. Ein einfaches Atommodell zur Erklärung der Polarisation bei angelegtem Feld: **a** ohne Feld, **b** mit Feld

rein elektronische Nichtlinearitäten wird das typische interne Feld durch das elektrische Feld einer Elementarladung, $e = e_0 = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$, im Abstand einer typischen atomaren Distanz d_a erzeugt, d.h.

$$E_a = \frac{e_0}{4\pi\epsilon_0 d_a^2} = 1,4 \cdot 10^{11} \frac{V}{m}. \quad (5.8)$$

Dabei ist $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$ die Dielektrizitätskonstante des Vakuums. Wir sehen schon aus der Stärke des intraatomaren elektrischen Feldes, dass die zu erwartenden nichtlinearen Effekte klein sein werden. Um zu physikalisch wichtigen Größen zu gelangen, berechnen wir die zu erwartende dielektrische Polarisation elektronischen Ursprungs in einem typischen Medium. Bei einem typischen festen oder flüssigen Medium entspricht 1 cm^3 in etwa einem Mol dieser Substanz, d.h. in 1 cm^3 finden wir in etwa $N_A = 6 \cdot 10^{23}$ Atome. Damit erhalten wir mit dem Dipolmoment nach (5.7)

$$P = \epsilon_0 \left[\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots \right] \quad (5.9)$$

mit den nichtlinearen Suszeptibilitäten $\chi^{(i)}$, welche in Tabelle 5.1 zusammengefasst sind. Speziell die Suszeptibilität 1. Ordnung erlaubt die Berechnung des bereits kennengelernten Brechungsindex gemäß

$$n^2 = \left(1 + \chi^{(1)} \right). \quad (5.10)$$

Wie Tabelle 5.1 zeigt ergibt sich aus unserem Modell für den Brechungsindex der Wert $n = 2,9$. Der Brechungsindex von Quarz ist 1,45. Unser einfaches Modell erzeugt also Werte von der richtigen Größenordnung [7].

Tabelle 5.1. Nichtlineare Suszeptibilitäten der verschiedenen Ordnungen. Für deren Berechnung nach obigem einfachen Modell wurden folgende Konstanten verwendet: $d_a = \alpha^{(i)} = 10^{-10} \text{ m}$, $e = e_0 = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$, $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$, $E_a = \frac{e_0}{4\pi\epsilon_0 d_a^2} = 1,4 \cdot 10^{11} \text{ V/m}$, $N = 6 \cdot 10^{23} \cdot 10^6 \text{ m}^{-3}$

Nr.	$\chi^{(i)}$	Modellwert	typ. Materialwert
1	$\chi^{(1)} = \frac{Ne\alpha^{(1)}}{\epsilon_0 E_a}$ $= 7,5$	$n = 2,9$	Quarz: $n = 1,45$
2	$\chi^{(2)} = \frac{Ne\alpha^{(1)}}{\epsilon_0 E_a^2}$ $= 5,4 \cdot 10^{-11} \frac{m}{V}$	$V_\pi = \frac{\lambda n_0}{\chi^{(2)}} = 30 \text{ kV}$	KdP: $n_0 = 2,3$, $V_\pi = 7,5 \text{ kV}$
3	$\chi^{(3)} = \frac{Ne\alpha^{(1)}}{\epsilon_0 E_a^3}$ $= 3,7 \cdot 10^{-22} \frac{\text{m}^2}{\text{V}^2}$	$n_2 = \frac{3\chi^{(3)}}{4n_0^2 \epsilon_0 e_0}$ $= 1,25 \cdot 10^{-20} \frac{\text{m}^2}{W}$	Quarz: $n_2 = 3,2 \cdot 10^{-20} \frac{\text{m}^2}{W}$

5.3.2 Wichtige nichtlineare Prozesse

Wie aus (5.9) ersichtlich ist, werden wir im Polarisationsterm k -ter Ordnung all jene Frequenzkomponenten finden, welche sich bei Bildung der k -ten Potenz des sich im Medium ausbreitenden Feldes ergeben. Nehmen wir an, das Feld setzt sich aus zwei ebenen Wellen mit zwei verschiedenen Frequenzen ω_1 und ω_2 und den entsprechenden Wellenzahlen zusammen, so ergibt sich für den nichtlinearen Prozess 2. Ordnung

$$E^2 = \left(\hat{E}_1 \cos(k_1 z - \omega_1 t + \varphi_1) + \hat{E}_2 \cos(k_2 z - \omega_2 t + \varphi_2) \right)^2. \quad (5.11)$$

Nach dem Ausmultiplizieren erhalten wir

$$\begin{aligned} E^2 = & \hat{E}_1^2 \cos^2(k_1 z - \omega_1 t + \varphi_1) + \hat{E}_2^2 \cos^2(k_2 z - \omega_2 t + \varphi_2) \\ & + 2\hat{E}_1 \hat{E}_2 \cos(k_1 z - \omega_1 t + \varphi_1) \cos(k_2 z - \omega_2 t + \varphi_2). \end{aligned} \quad (5.12)$$

Mit dem Additionstheorem für die Kosinusfunktion

$$\cos(\alpha) \cdot \cos(\beta) = \frac{1}{2} [\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)]$$

finden wir schließlich

$$\begin{aligned} E^2 = & \frac{1}{2} \left(\hat{E}_1^2 + \hat{E}_2^2 \right) \\ & + \frac{1}{2} \left(\hat{E}_1^2 \cos[2(k_1 z - \omega_1 t + \varphi_1)] + \hat{E}_2^2 \cos[2(k_2 z - \omega_2 t + \varphi_2)] \right) \\ & + \hat{E}_1 \hat{E}_2 \cos((k_1 - k_2)z + (\omega_1 - \omega_2)t + \varphi_1 - \varphi_2) \\ & + \hat{E}_1 \hat{E}_2 \cos((k_1 + k_2)z + (\omega_1 + \omega_2)t + \varphi_1 + \varphi_2). \end{aligned} \quad (5.13)$$

Also führt bereits die Polarisierung 2. Ordnung zur Abstrahlung von Wellen mit neuen Frequenzen. Die Erzeugung neuer Frequenzen ist das Wesen eines nichtlinearen Prozesses. In Tabelle 5.2 sind die verschiedenen nichtlinearen Prozesse 2. Ordnung, welche sich aus (5.13) ergeben, und einige wichtige Prozesse 3. Ordnung aufgeführt.

Bisher haben wir nur die Polarisierung eines Atoms betrachtet. Meist sind die Atome in Kristallstrukturen eingebunden. Die Symmetrieeigenschaften dieser Kristalle spielen eine wesentliche Rolle dabei, ob ein bestimmter nichtlinearer optischer Effekt in diesem Kristall überhaupt möglich ist oder nicht [2].

Linearer elektrooptischer Effekt, Pockel-Effekt. Der lineare elektrooptische Effekt, auch Pockel-Effekt genannt, führt dazu, dass sich der Brechungsindex in bestimmten Raumrichtungen für eine Welle ändert, wenn an den Kristall, z.B. KDP (Kaliumdihydrogenphosphat) [2], in einer bestimmten

Tabelle 5.2. Einige wichtige nichtlineare Suszeptibilitäten und zugehörige nichtlineare Prozesse. Das erste Argument in der Suszeptibilität gibt die Frequenz der erzeugten Welle an; die Argumente nach dem Strichpunkt die Frequenzen der Eingangswellen

Suszeptibilität	Prozess
$\chi^{(2)}(2\omega_1; \omega_1, \omega_1)$	Frequenzverdopplung
$\chi^{(2)}(\omega_3; \omega_1, \pm\omega_2)$	Summen- und Differenzfrequenz Erzeugung, parametrische Verstärkung
$\chi^{(2)}(\omega_1; \omega_1, 0)$	linearer elektrooptischer Effekt, Pockel-Effekt
$\chi^{(2)}(0; \omega_1, -\omega_1)$	Optische Gleichrichtung
$\chi^{(3)}(\omega_1; \omega_1, 0, 0)$	Gleichspannungs-Kerr-Effekt
$\chi^{(3)}(\omega_1; \omega_1, \omega_1, -\omega_1)$	Selbstphasenmodulation
$\chi^{(3)}(3\omega_1; \omega_1, \omega_1, \omega_1)$	Frequenzverdreifachung

Richtung ein elektrisches Feld angelegt wird. Die betreffenden Richtungen ergeben sich aus den Tensoreigenschaften der nichtlinearen Suszeptibilität, auf welche wir aber aus Zeitgründen hier nicht eingehen wollen [2]. Legt man an diesen Kristall, wie in Abb. 5.7 gezeigt, in z -Richtung ein konstantes elektrisches Feld E_z an, so entsteht eine Brechungsindexdifferenz für die in x' - und y' -Richtung polarisierten Wellen. Man nennt dies *induzierte Doppelbrechung*. Der Phasenunterschied $\Delta\phi$ zwischen den beiden linear polarisierten Teilwellen nach Durchlaufen des Kristalles ist

$$\Delta\phi = k(n_{x'} - n_{y'})L \quad \text{mit} \quad n_{x'} - n_{y'} = \frac{\chi^{(2)}E_z}{2n_0}. \quad (5.14)$$

Die Stärke des linearen elektrooptischen Effekts für einen gegebenen Kristall lässt sich nun anhand der Spannung $V_\pi = E_z \cdot L$ charakterisieren, die in z -Richtung angelegt werden muss, damit ein Phasenunterschied von π erreicht

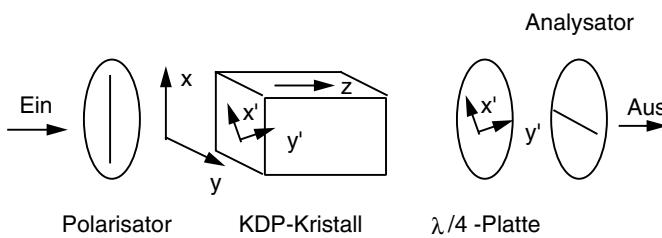


Abb. 5.7. Elektrooptischer Modulator auf der Basis des Pockel-Effekts

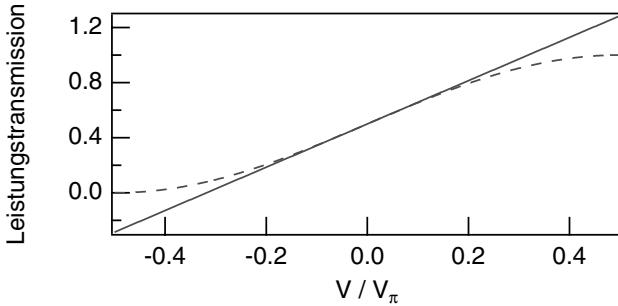


Abb. 5.8. Transmission des elektrooptischen Modulators aus Abb. 5.7

wird. Es gilt

$$V_\pi = \frac{\lambda n_0}{\chi^{(2)}}. \quad (5.15)$$

Die entsprechenden experimentellen Werte der Spannung V_π für KDP und der entsprechende Wert für unser einfaches Modell finden sich in Tabelle 5.1 für eine Wellenlänge von $\lambda = 0.55 \mu\text{m}$. Wir erhalten wiederum eine gute größerenordnungsmäßige Übereinstimmung.

Für die Leistungstransmission von Eingang zu Ausgang der gesamten Anordnung in Abb. 5.7 ergibt sich

$$T = \frac{1}{2} \left[1 + \sin \left(\pi \frac{V}{V_\pi} \right) \right], \quad (5.16)$$

wie in Abb. 5.8 dargestellt. Wie aus dieser Abbildung folgt, kann die Anordnung zur Modulation der Lichtleistung durch ein elektrisches Signal benutzt werden. Bei voller Durchmodulation kann die Anordnung auch als Schalter verwendet werden.

Selbstphasenmodulation. In einem isotropen und homogenen Medium können aus Gründen der Symmetrie keine nichtlinearen Prozesse 2. Ordnung auftreten. Deshalb kann in einem solchen Medium der Brechungsindex in niedrigster Ordnung nur quadratisch vom Feld abhängen, d.h. der Brechungsindex hat einen Anteil proportional zur Intensität der Welle $I \approx \hat{E}^2$:

$$n = n_0(\omega) + n_2 I. \quad (5.17)$$

Das heißt, während der Ausbreitung erfährt das Maximum des Pulses eine größere Phasenverschiebung als die Flügel des Pulses; man spricht von *Selbstphasenmodulation*, (s. Tabelle 5.2). Der entsprechende Wert aus unserem einfachen Modell und für Quarz ist wieder in Tabelle 5.1 eingetragen. Die Übereinstimmung ist wiederum sehr gut.

Optische Solitonen. Der intensitätsabhängige Brechungsindex ist besonders wichtig in der optischen Kommunikation und in Femtosekundenlasern. Es zeigt sich, dass sich in einem Medium mit negativer Dispersion und positiver Selbstphasenmodulation besondere Pulsformen ungestört ausbreiten können, sog. Solitonen. Dies sind Pulse der Form

$$A_s(t) = A_0 \frac{1}{\cosh\left(\frac{t}{\tau}\right)}, \quad (5.18)$$

wobei A_0 die Amplitude des Pulses und τ die Pulsbreite ist. Negative Dispersion bedeutet, dass hohe Frequenzen eine größere Gruppengeschwindigkeit besitzen als niedrige Frequenzen. Negative Dispersion muss künstlich z.B. durch geeignete Prismenpaare in Femtosekundenlasern erzeugt werden. Standard Glasfasern zeigen für Wellenlängen größer als $1,3 \mu\text{m}$ automatisch negative Dispersion (s. Abb. 5.4) [9, 14].

5.4 Erzeugung von kurzen Laserpulsen

Das stark vereinfachte Modell eines Lasers ist in Abb. 5.9a dargestellt [8]. Ein Laser besteht im einfachsten Fall aus einem Resonator, welcher hier durch zwei Spiegel erzeugt wird, und einem optisch aktiven Medium, welches die elektromagnetischen Wellen bei Durchgang in einem gewissen Frequenzbereich verstärkt, (s. Abb. 5.9b), wie in Kap. 5.2.2 besprochen. Einer der Endspiegel ist teildurchlässig, sodass ein kleiner Teil des Lichts im Resonator bei jedem Umlauf auskoppelt. Wir betrachten im Folgenden nur eine Polarisierung im Laser, was für das prinzipielle Verständnis der Modenkopplung in sehr vielen Fällen genügt. Es soll aber nicht verheimlicht werden, dass Polarisationsrotationseffekte für die Modenkopplung in Faserlasern eine sehr wichtige Rolle spielen [8].

Infolge des Resonators können sich im stationären Betrieb nur jene Frequenzen aufbauen, deren Phasen sich nach einem Umlauf gerade um ein Vielfaches von 2π unterscheiden (s. Abb. 5.10). Diese Frequenzen sind die Vielfachen der inversen Resonatorumlaufzeit $T_R = 2L/c$. Die entsprechenden Moden nennt man die axialen Moden des Lasers. Für ein genaueres Studium der Modenstruktur in einem Laser und den Resonatorentwurf sei auf [17, 18, 23, 24] verwiesen.

Wird der Laser zunächst durch das Einfügen hoher Verluste blockiert, so wird sich infolge des optischen Pumpvorgangs eine hohe Inversion bzw. ein hoher optischer Gewinn aufbauen, der ungesättigte Gewinn (s. Abb. 5.9b). Werden die hohen Verluste entfernt, so ist der Gewinn höher als die Verluste infolge der Auskopplung, und es werden jene Moden innerhalb der Gewinnbandbreite anschwingen, die einen Netto Gewinn erfahren. Das sich aufbauende Feld reduziert durch stimuliertes Emission die Inversion im Verstärkermedium und daher den Gewinn. Man spricht von *Gewinnsättigung*. Dieser Vorgang setzt sich in einem Laser mit homogen verbreiteter Verstärkungslinie solange

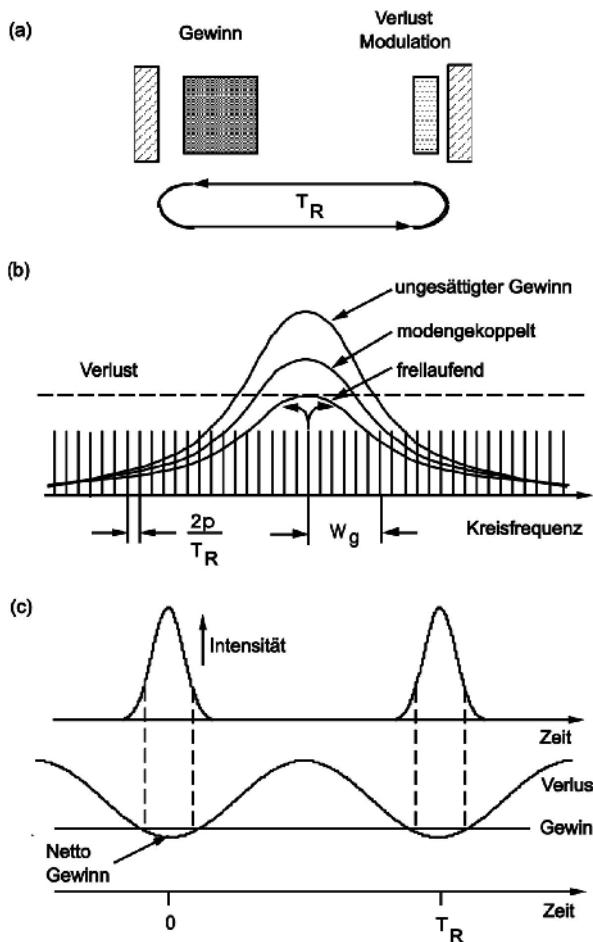


Abb. 5.9. (a) Schematischer Aufbau eines Lasers zur Güteschaltung bzw. Modenkopplung. (b) Longitudinale Lasermoden und Verstärkungsprofil des Lasers im ungesättigten, freilaufenden und modengekoppelten Betrieb. (c) Beschreibung der Modenkopplung im Zeitbereich als zeitabhängiger Verlust

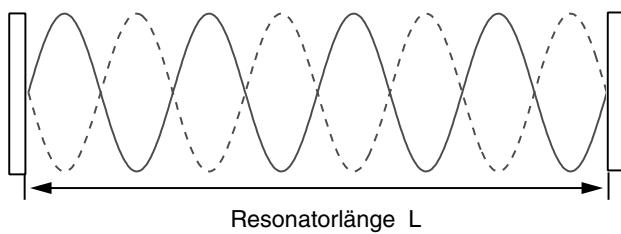


Abb. 5.10. Fabry-Perot-Resonator

fort bis nur noch der Mode, welche beim Gewinnmaximum liegt, keinen Nettoverlust oder Verlust pro Umlauf erfährt. Die benachbarten Moden erleiden dann einen Nettoverlust pro Umlauf und können daher im stationären Betrieb nicht mehr schwingen. Der Laser arbeitet dann im Einmodenbetrieb und gibt kontinuierliches Laserlicht ab. Aufgrund anderer Effekte, wie z.B. inhomogen verbreiterte Verstärkerlinien, können auch einige benachbarte Moden im stationären Betrieb oszillieren.

Zur Erzeugung kurzer Laserpulse gibt es im Wesentlichen zwei Methoden: die Güteschaltung und die Modenkopplung. Die Güteschaltung wurde zuerst von Hellwarth [10] vorgeschlagen.

5.5 Güteschaltung

Das Verhalten des Lasers wird sehr viel komplexer, wenn wir in den Resonator zeitlich veränderliche Verluste einbringen. Diese Verluste können durch ein angelegtes Hochfrequenzsignal periodisch moduliert werden. Man spricht von *aktiver Modulation*. Dies kann z.B. durch die im vorigen Abschnitt diskutierte Pockel-Zelle oder durch einen akustooptischen Modulator (AOM) geschehen, welcher einen Teil des Lichts pro Umlauf aus dem Resonator streut. Oder die Verluste werden durch einen sättigbaren Absorber erzeugt, dessen Absorption infolge des Lichtfeldes im Resonator selbst moduliert wird (s. Abb. 5.9a). Man spricht dann von *passiver Modulation*.

5.5.1 Aktive Güteschaltung

Wir beschränken uns zunächst auf den Fall, dass nur ein axialer Mode des Lasers unter der Verstärkungslinie ist und der Verlust zu Beginn sehr hoch sei, d.h. die Güte des Resonators ist sehr niedrig (Abb. 5.11). Infolge des Pumpens des Verstärkermediums wird sich ein hoher Gewinn im Verstärkermedium aufbauen, d.h. wir speichern Energie im Verstärkermedium. Nachdem die Verstärkung einen bestimmten Wert überschritten hat, werden die

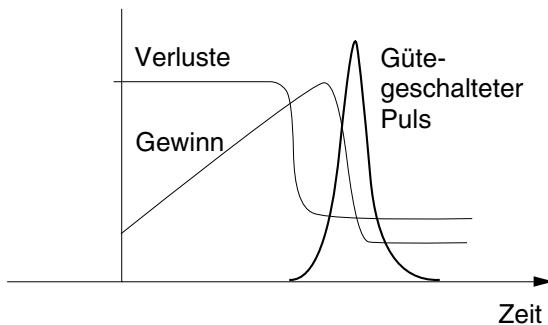


Abb. 5.11. Dynamik von Gewinn, Verlust und Lichtleistung bei aktiver Güteschaltung

Verluste plötzlich verringert, z.B. indem man die Pockel-Zelle auf hohe Transmission schaltet. Wir schalten zu einer hohen Güte des Resonators, deshalb heißt diese Methode *Güteschaltung*. Dann baut sich innerhalb einiger Resonatorumläufe exponentiell das Lichtfeld im Resonator auf. Die Energie, die im Verstärkermedium über lange Zeit aufgebaut wurde, entlädt sich in sehr kurzer Zeit als ein intensiver Laserpuls. Typische Werte für die Pulsenergie liegen im Bereich von μJ – J , wobei die Pulslänge mindestens einige Resonatorumlaufzeiten beträgt. Typische Werte für die Pulslänge sind 100 ps–100 ns, und die typischen Pulswiederholraten liegen je nach System bei einigen kHz–MHz.

5.5.2 Passive Güteschaltung

Bei der passiven Güteschaltung wird ein sättigbarer Absorber zur Güteschaltung genutzt. Ist die sättigbare Absorption groß genug, so kommt es zur Selbstpulsation des Lasers. Die Zeitabhängigkeit von Gewinn, Verlust und Lichtleistung im Resonator sind in Abb. 5.12 gezeigt. Solche Laser können sehr kompakt gebaut werden, wenn man Halbleitermaterialien als sättigbare Absorber, Mikrochiplaserkristalle als Verstärkermaterial verwendet und den Laserkristall mit Halbleiterdiodenlasern pumpt (Abb. 5.13) [3, 26].

Mit diesen kompakten Lasern erreicht man Pulslängen unter 100 ps, μJ Pulsennergien und Pulswiederholraten wie bei den aktiv gütegeschalteten Lasern. Sie finden Verwendung in der LIDAR-Technik (Light Detection and Ranging), Spektroskopie und Medizin.

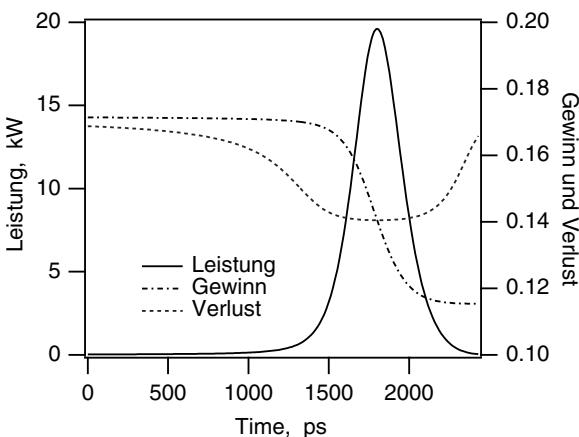


Abb. 5.12. Dynamik von Gewinn, Verlust und Laserleistung eines passiv gütegeschalteten Lasers

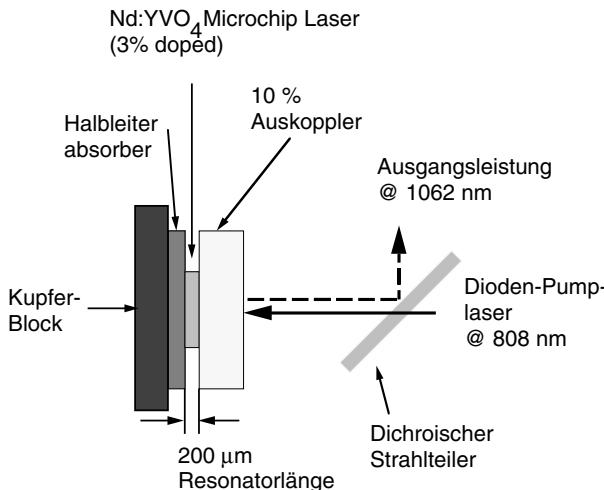


Abb. 5.13. Kompakter Aufbau eines passiv gütegeschalteten Mikrochiplasers

5.6 Modenkopplung

Um Pulse kürzer als die Resonatorumlaufzeit zu erzeugen, ist es notwendig, mehrere longitudinale Moden des Lasers in Oszillation zu halten und diese phasenstarr miteinander zu verkoppeln. Dann kommt es, wie bereits in Kap. 5.1 besprochen, zur negativen Interferenz der Moden, also zur Auslösung des Feldes über einen großen Bereich des Resonators. Nur in dem Bereich, in welchem alle Moden in Phase schwingen, kommt es zur positiven Interferenz der Wellen und damit zur Feldüberhöhung. Die Pulslänge ist im Wesentlichen gegeben durch die Resonatorumlaufzeit geteilt durch die Anzahl der Moden, welche im stationären Zustand phasenstarr zueinander oszillieren. Typische Resonatorlängen sind in etwa 3 m, d.h. $T_R = 10 \text{ ns}$. Mit modernen Modenkopplungstechniken können heute bis zu 1 Mio. Moden gleichzeitig phasenstarr gekoppelt werden, d.h. man erreicht Pulskürzen von unter 10 fs. Dies ist so kurz, dass man nur noch durch Vergleich erahnen kann, wie kurz diese Zeitdauer ist. Das Verhältnis zwischen 1 s und 10 fs ist genauso groß wie zwischen 200 Mio. Jahren und 1 min. Zeiträume von 1 s bzw. 1 min sind für uns erfahrbar. Vor 200 Mio. Jahren, dies entspricht dem Erdmittelalter, sind etwa die Dinosaurier ausgestorben. Gleichzeitig tritt bei einer mittleren Leistung von nur 1 W infolge der Pulsbildung eine Spitzenleistung von 1 MW auf.

Wie erzeugt man nun diese phasenstarre Kopplung zwischen den Moden?

5.6.1 Aktive Modenkopplung

Die prinzipielle Anordnung des modengekoppelten Lasers entspricht der des gütegeschalteten Lasers. Aber jetzt modulieren wir die Verluste im Laser-

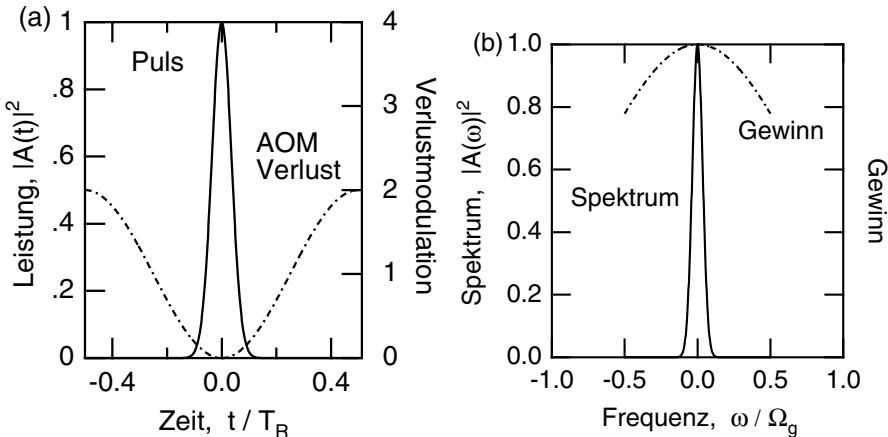


Abb. 5.14. (a) Die Verlustmodulation verkürzt den Puls pro Umlauf. (b) Die endliche Gewinnbandbreite verlängert den Puls pro Umlauf

resonator gerade mit der Umlauffrequenz $1/T_R$ des Laserresonators, wie in Abb. 5.9c gezeigt. Da die Modulation synchron mit dem umlaufenden Feld ist, werden jene Feldanteile abgebaut, die einen Nettoverlust erfahren. Nur jene, die pro Umlauf einen Nettogewinn erfahren, können im stationären Zustand oszillieren. Dass nun mehrere Moden stationär schwingen können, kommt dadurch zustande, dass der Modulator pro Umlauf immer Energie von jeweils einem Mode in die benachbarten Moden streut. Dieser Energieverteilungsmechanismus zwischen den Moden infolge des Modulators kompensiert den reduzierten Gewinn der Lasermoden weit ab vom Maximum des Gewinns (Abb. 5.14a,b). Dadurch entsteht ein Puls, der den Verlustmodulator gerade dann durchläuft, wenn dieser minimale Verluste einfügt. Der Laser minimiert seine Verluste. Im stationären Betrieb wird der Puls beim Durchlaufen des Modulators verkürzt, da die Flügel des Pulses höhere Verluste erfahren als das Pulsmaximum, d.h. das Spektrum wird verbreitert. Diese Pulsverkürzung wird gerade kompensiert durch die Pulsverlängerung, welche durch die Filterwirkung des Verstärkungsprofils pro Umlauf erzeugt wird. Das Resultat ist ein Gauß-förmiger Puls [5, 21]

$$A(t) = \sqrt{I_0} e^{-\frac{t^2}{2\tau_a^2}} \quad (5.19)$$

mit einer Breite τ_a und der Spitzenleistung I_0 . Die Pulsdauer ist durch die vierte Wurzel aus dem Verhältnis zwischen der Krümmung des Verstärkungsprofils D_g und der Krümmung der Verlustmodulation M_s gegeben:

$$\tau_a = \sqrt[4]{\frac{D_g}{M_s}}. \quad (5.20)$$

Für ein Lorentz-förmiges Verstärkungsprofil mit dem Gewinn g im stationären Betrieb und einer kosinusförmigen Modulation mit der Modulations-

tiefe M und der Modulationsfrequenz $\omega_M = 2\pi/T_R$ gilt

$$D_g = \frac{g}{\Omega_g^2}, \quad (5.21)$$

$$M_s = \frac{M\omega_M^2}{2}. \quad (5.22)$$

Aus (5.20)–(5.22) folgt für $M = 2g$, dass die Pulskürze im Wesentlichen durch das geometrische Mittel aus der Resonatorumlaufzeit und der inversen halben Halbwertsbreite des Verstärkungsprofils gegeben ist:

$$\tau_a = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{T_R}{\nu_g}} \quad \text{mit} \quad \nu_g = \frac{\Omega_g}{2\pi}.$$

Meist wird für die Pulsbreite die volle Halbwertsbreite der Intensität des Laserpulses angegeben, welche durch

$$\tau_{a,FWHM} = 1.66 \tau_a \quad (5.23)$$

gegeben ist. Typische Werte für die Pulslänge von aktiv modengekoppelten Lasern für einige wichtige Lasertypen sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Aktive Modenkopplung kann auch durch Phasenmodulation infolge einer Brechungsindexmodulation erreicht werden. Meist sind die entsprechenden Pulse etwas kürzer, da eine hohe Brechungsindexmodulation technisch einfacher realisierbar ist als eine hohe Verlustmodulation. Der Pulsverkürzungsmechanismus ist bei Indexmodulation völlig verschieden von dem der Verlustmodulation. Für eine Diskussion sei hier auf die Literatur verwiesen [21].

Tabelle 5.3. Typische Pulslängen für aktiv modengekoppelte Laser. Zur Berechnung wurde angenommen: $M = 2g$, d.h. $\tau_{a,FWHM} = \frac{1.66}{2\pi} \sqrt{\frac{T_R}{\nu_g}}$ mit $T_R \approx 10 \text{ ns}$

Verstärker Material	$\frac{\nu_g}{(\text{THz})}$	$\frac{\tau_{a,FWHM}}{(\text{ps})}$
Nd:YAG	0,06	100
Nd:Glas	4	13
Cr:LiSAF	32	4,6
Ti:Saphir	43	4

5.6.2 Passive Modenkopplung

In diesem Abschnitt wollen wir uns nur auf die passive Modenkopplung von Festkörperlasern beschränken, welche nur eine schwache Wechselwirkung mit dem Lichtfeld zeigen. Die ultrakurze Pulserzeugung war über viele Jahre

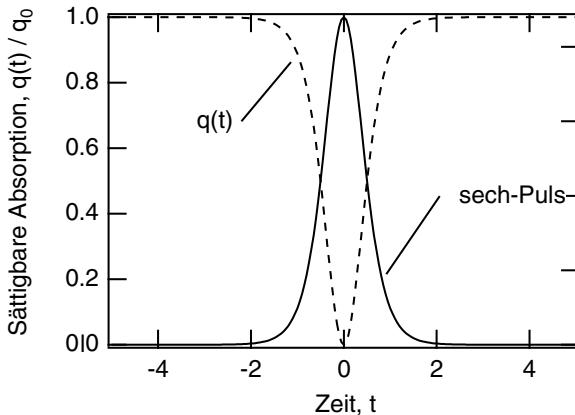


Abb. 5.15. Intensität des Pulses und daraus resultierende sättigbare Absorption für einen schnellen sättigbaren Absorber

hinweg durch die Farbstofflaser dominiert. Aber Ende der 80er Jahre wurden neue, extrem breitbandige Festkörperlaser entwickelt, wie etwa der Ti:Saphir-Laser (s. Tabelle 5.3). Seither verdrängen die Festkörperlaser die viel wartungsintensiveren Farbstofflaser. Mit dem Ti:Saphir-Laser wurden bisher die kürzesten optischen Pulse von nur 6,5–8 fs direkt aus dem Laser erzeugt [13, 25, 27]. Mit externer Kompression wurden sogar 4–5 fs kurze Pulse mit zum Teil sehr hohen Pulsenenergien erzielt [1, 4].

Wie bei der Güteschaltung kann auch hier die Verlustmodulation durch einen sättigbaren Absorber erreichen. Damit spart man sich nicht nur die Kosten für den Modulator, die entsprechende Hochfrequenzansteuerung und die Elektronik, sondern man erreicht auch noch wesentlich kürzere Pulse als bei der aktiven Modenkopplung. Dies ist sehr einfach zu verstehen. Nehmen wir z.B. an, wir haben einen schnellen sättigbaren Absorber, d.h. die sättigbare Absorption q pro Resonatorumlauf ist direkt proportional zur Intensität I des Pulses (s. Abb. 5.15) [6]

$$q(A) = q_0 - \gamma I(t). \quad (5.24)$$

Da sich der Absorber instantan wieder erholt, ist die Krümmung der Verluste nun selbst durch die Pulskürze bestimmt, d.h. je kürzer der Puls umso stärker ist die Krümmung. Wie sich zeigen lässt ist die stationäre Pulsform für diesen Fall ein Secanshyperbolicus:

$$A(t) = \sqrt{I_0} \operatorname{sech} \left(\frac{t}{\tau} \right) = \sqrt{I_0} \frac{1}{\cosh \left(\frac{t}{\tau} \right)}. \quad (5.25)$$

Wir erhalten damit für die Krümmung der Verlustmodulation $M_s = \gamma I_0 / \tau^2$. Substituieren wir diese Krümmung in (5.20) und lösen nach der neuen Puls-

breite auf, so finden wir

$$\tau = \sqrt{D_g} \gamma I_0 = \frac{1}{\Omega_g} \sqrt{\frac{g}{\gamma I_0}}. \quad (5.26)$$

Für die volle Halbwertsbreite des sech²-Pulses findet man dann

$$\tau_{FWHM} = 1,76\tau. \quad (5.27)$$

Wie (5.26) zeigt, ist die erreichbare Pulslänge bei der passiven Modenkopplung direkt proportional zur inversen Bandbreite des Verstärkermediums im Gegensatz zur aktiven Modenkopplung. Beträgt der gesättigte Gewinn g pro Resonatorumlauf nur einige Prozent, so kann man bereits mit einem Bruchteil von einem Prozent an sättigbarer Absorption einen erheblichen Teil der gesamten Verstärkungsbandbreite modenkoppeln. Als sättigbare Absorber eignen sich insbesondere Halbleiterabsorber [15, 16] oder sog. künstliche Absorber, welche unter Ausnutzung der in Kap. 5.2 besprochenen nichtlinearen optischen Effekte wie z.B. dem intensitätsabhängigen Brechungsindex zustande kommen. Daraus resultieren Namen wie *Kerr-Lens-Modelocking* (KLM) oder *Additive-Puls-Modelocking* (APM) [12].

5.7 Lasersysteme

5.7.1 Kompakter diodengepumpter modengekoppelter Laser

Abbildung 5.16 zeigt einen modernen diodengepumpten Femtosekundenfestkörperlaser [20]. Das Prismenpaar dient zur Kompensation der im Laserkristall auftretenden positiven Dispersion, sodass sich insgesamt über einen

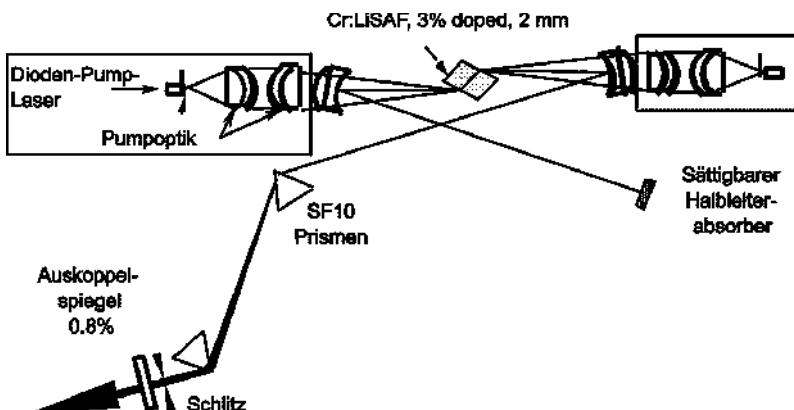


Abb. 5.16. Moderner diodengepumpter Femtosekundenfestkörperlaser mit einem Halbleiterabsorber als Modenkopplungselement und einem Prismenpaar zur Dispersionskompensation nach [20]

Resonatorumlauf eine negative Dispersion ergibt. Zusammen mit der Selbstphasenmodulation im Laserkristall ergibt sich dann eine solitonartige Pulsformung. Der Puls wird gestartet und stabilisiert durch einen Halbleiterabsorber.

5.7.2 Regenerativer Verstärker

Oft ist die Pulsenegie direkt aus einem modengekoppelten Laser, welche bei Festkörperlasern in der Regel im Bereich von einigen nJ liegt, zu gering um nichtlineare optische Effekte zu untersuchen bzw. auszunützen. Dann kann man, wie in Abb. 5.17 skizziert, jeden tausendsten oder sogar millionsten Puls auswählen und in einem regenerativen Verstärker in den mJ -J-Bereich nachverstärken. Diese Pulse sind dann intensiv genug, um selbst nichtlineare Effekte höherer Ordnung effizient anzuregen.

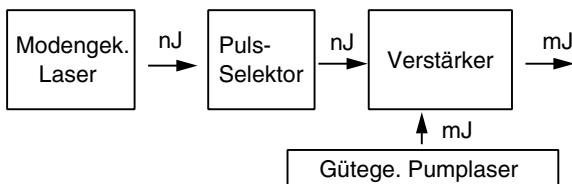


Abb. 5.17. Modengekoppelter Laser mit nachgeschaltetem regenerativen Verstärker, welcher von einem gütegeschalteten Laser gepumpt wird

Literatur

1. Baltuska A, Wei Z, Pshenichnikov MS, Wiersma DA (1997) Optical pulse compression to 5 fs at 1 MHz repetition rate. *Opt Lett* 22:102–104
2. Boyd RW (1992) Nonlinear Optics. Academic Press, New York
3. Braun B, Kärtner FX, Zhang G, Moser M, Keller U (1997) 56 ps passively Q-switched diode-pumped microchip laser. *Opt Lett* 22:382
4. Nisoli M, De Silvestri S, Svelto O, Szipcs R, Ferenz K, Spielmann C, Sartania S, Krausz F (1997) Compression of high-energy laser pulses below 5 fs. *Opt Lett* 22:522
5. Haus HA (1975) A theory of forced mode locking. *IEEE Journal of Quantum Electronics* QE-11:323–330
6. Haus HA (1975) Theory of modelocking with a fast saturable absorber. *J Appl Phys* 46:3049–3058
7. Haus HA (1992) Waveguide optoelectronics. In: March JH De La Rue RM (eds) *Waveguide optoelektronics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
8. Haus HA (1995) Short pulse generation. In Duling III IN (ed) *Compact sources of ultrashort pulses*. Cambridge University Press, New York

9. Haus HA (1993) Optical fiber solitons: their properties and uses. *Proc IEEE* 81:970–983
10. Hellwarth RW (ed) (1961) *Advances in quantum electronics*. Columbia Press, New York
11. Holzapfel W, Finkele U, Kaiser W, Oesterhelt D, Scheer H, Stilz HU, Zinth W (1989) Observation of a bacteriochlorophyll anion radical during the primary separation in a reaction center. *Chem Phys Lett* 160:1–4
12. Ippen EP (1994) Principles of passive mode locking. *Appl Phys B* 58:159–170
13. Jung I, Kärtner FX, Matuschek N, Sutter DH, Morier-Genoud F, Zhang G, Keller U, Scheuer V, Tilsch M, Tschudi T (1997) Self-starting 6.5 fs pulses from a Ti:sapphire Laser. *Opt Lett* 22:1009–1011
14. Kärtner FX (1995) Optische Solitonen, Grundlagen und Anwendungen. *Physik in unserer Zeit* 26:152–3161
15. Keller U, Weingarten k, Kärtner FX, Kopf D, Jung ID (1996) Semiconductor saturable absorber mirrors (SESAMs) for femtosecond to nanosecond pulse generation in solid-state lasers. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics (JSTQE) on Ultrafast Electronics, Photonics, and Optoelectronics* 2:435–453
16. Keller U (1994) Ultrafast all-solid-state laser technology. *Appl Phys B* 58:347–363
17. Kneubühl FK, Sigrist MW (1991) *Laser*, 3rd edn. Teubner, Stuttgart
18. Kogelnik H, Li T (1966) Laser beams and resonators. *Appl Opt* 5:1550–1566
19. Kogelnik H, Ippen EP, Dienes A, Shank CV (1972) Astigmatically compensated cavities for CW dye lasers. *IEEE J. Quantum Electron. QE-8*:373–379
20. Kopf D, Weingarten KJ, Brovelli L, Kamp M, Keller U (1994) Diode-pumped 100-fs passively mode-locked Cr:LiSAF using an A-FPSA. *Opt Lett* 19:2143–2145
21. Kuizenga DJ, Siegman AE (1970) FM and AM modelocking of the homogeneous laser – part I: theory. *IEEE J. Quant Electron* 6:694–701
22. Shah J (1996) *Ultrafast spectroscopy of semiconductors and semiconductor nanostructures*. Springer Series in Solid-State Sciences, vol 115. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
23. Siegman AE (1986) *Lasers*. University Science Books, Mill Valley, California
24. Svelto O (1989) *Principles of lasers*, 3rd edn. Plenum Press, New York London
25. Lin Xu, Spielmann C, Krausz F, Szipöcs R (1996) Ultrabroadband ring oscillator for sub-10 fs pulse generation. *Opt Lett* 21:1259–1261
26. Zayhowski JJ, Dill C (1994) Diode-pumped passively Q-switched picosecond microchip lasers. *Opt Lett* 19:1427–1429
27. Zhou J, Taft G, Huang C-P, Murnane MM, Kapteyn HC, Christov IP (1994) Pulse evolution in a broad-bandwidth Ti:sapphire laser. *Opt Lett* 19:1149–1151

6 Lineare Laserspektroskopiemethoden

T. Dreier

6.1 Lineare Laserspektroskopiemethoden

6.1.1 Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)

Die laserinduzierte Fluoreszenz stellt eine der empfindlichsten rein optischen laserspektroskopischen Verfahren für die Untersuchung einer großen Zahl von Atomen und Molekülen dar [5]. Die Methode ist besonders zum Nachweis von Radikalen in der Gasphase wie OH, NH, CN, HCO und anderen geeignet, da diese Moleküle starke elektronische Übergänge im nahen ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich besitzen. Laserlicht für diese Wellenlängenbereiche ist direkt oder nach Frequenzkonversion in nichtlinearoptischen Kristallen (BBO, KDP) zugänglich. Zahlreiche kleinere Atome absorbieren allerdings erst im vakuumultravioletten Spektralbereich, H-Atome etwa bei dem nach seinem Entdecker benannten Lyman- α -Übergang bei 121 nm. Um trotzdem unter atmosphärischen Bedingungen arbeiten zu können, weicht man dann häufig auf Mehrphotonenanregungs- und -nachweisschemata aus (Kap. 6.2).

Bei der laserinduzierten Fluoreszenz wird durch Absorption von Photonen in einem Atom oder Molekül ein angeregter Zustand bevölkert. Aus diesem heraus können Photonen entweder direkt emittiert werden oder durch intra- (ohne Stöße) bzw. intermolekulare (unter Beteiligung von Stößen anderer Moleküle) Energieumwandlungen in andere Niveaus des angeregten Zustands wechseln, von wo aus dann eine Emission von Photonen erfolgt. Abbildung 6.1 zeigt die Verhältnisse am Beispiel der Potentialkurven des OH-Radikals für die Anregung, d.h. Absorption der einfallenden Laserstrahlung und Emission der Fluoreszenzstrahlung. Der hier durch Absorption angeregte elektronische Zustand kann durch die Strahlung eines Excimer- oder frequenzverdoppelten Farbstofflasers erreicht werden. Es können aber auch höhere Schwingungs-Rotations-Zustände des elektronischen Grundzustands angeregt werden, wofür man Strahlung im infraroten Spektralbereich benötigt. Die Intensität der Infrarotfluoreszenz ist jedoch wesentlich geringer, da die Lebensdauer bis zur spontanen Emission aus dem angeregten Zustand für solche Übergänge groß ist. Sie wird daher nur für Untersuchungen bei niedrigem Druck eingesetzt, wo die Wahrscheinlichkeit für eine stoßinduzierte, d.h. strahlungslose „Lösung“ des angeregten Moleküls entsprechend geringer ist.

Der nach Absorption des Photons besetzte Zustand erfährt vor der Emission häufig eine Deaktivierung (Relaxation) in niedrigere Energieniveaus.

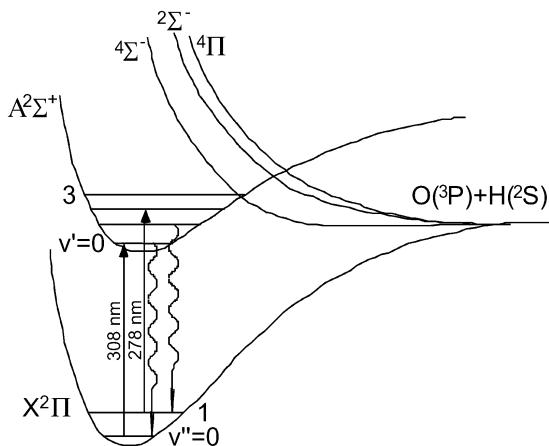


Abb. 6.1. Potentialkurven für die wichtigsten elektronischen Übergänge im OH-Radikal. Anregung in verschiedene Schwingungsniveaus des elektronischen $A^{-2}\Sigma$ -Zustands durch Absorption von UV-Strahlung aus dem elektronischen Grundzustand $X^2\Pi$ bei 308 bzw. 278 nm (gerade Pfeile) und nachfolgende Emission von Photonen (gewellte Pfeile)

Deshalb ist im Allgemeinen die ausgesendete Fluoreszenzstrahlung zu längeren Wellenlängen gegenüber der Anregungsstrahlung verschoben („Stokes-Shift“). Wenn das Molekül nach Emission in andere Schwingungs-Rotations-Zustände übergeht als demjenigen, aus dem heraus es angeregt wurde, wird die ausgesendete Fluoreszenzstrahlung schwächer. Absorptionsquerschnitte sind ein quantitatives Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon vom Molekül absorbiert wird. Als solches sind sie wesentlich größer als z.B. Raman-Streuquerschnitte. Deshalb ist die Empfindlichkeit der LIF zum Nachweis geringer Konzentrationen um viele Größenordnungen höher als die der spontanen Raman-Streuung, selbst wenn man für letztere häufig Laserstrahlung mit wesentlich höherer Intensität als bei der LIF einsetzt.

Folgende Überlegungen sollten bei der Ausführung eines LIF-Experiments berücksichtigt werden:

- Absorptions- und Emissionsspektrum müssen bekannt sein, denn man muss einerseits Laserstrahlung in dem entsprechenden Wellenlängenbereich für die Anregung bereitstellen, andererseits auch das vom Molekül emittierte Fluoreszenzlicht durch ein geeignetes optisches Filter vor dem Detektor von störendem Streulicht anderer Lichtquellen befreien (Tabelle 6.1).
- Das Molekül sollte im angeregten Zustand für einen Fluoreszenznachweis nicht durch weitere Zerfallsprozesse wie etwa Dissoziation oder Ionisation noch mehr zur Verfügung stehen.
- Die Strahlungslebensdauer muß bekannt sein: je kürzer sie ist, desto besser! Die Wahrscheinlichkeit der Emission von Photonen aus dem an-

Tabelle 6.1. Spektroskopische Daten zur LIF von zweiatomigen Spezies, die in der Flammendiagnostik eine wichtige Rolle spielen [5]. A ist der Einstein-Koeffizient für spontane Emission und Q die Rate der strahlungslosen Stoßlösung („Quenching“) der Anregungsenergie

Spezies	λ [nm]	A [10^8 s^{-1}]	Q [10^9 s^{-1}]
CH ($A^2\Delta - X^2\Pi$)	431,5	1,8	5,3
OH ($A^2\Sigma - X^2\Pi$)	306,4	1,4	5,6
NO ($A^2\Sigma - X^2\Pi_{1/2}$)	226,5	2,0	2,7

geregten Zustand ist proportional zum Einstein-A-Koeffizient für spontane Emission.

- Strahlungslose Prozesse aus dem angeregten Zustand heraus können das effektiv ausgesendete Fluoreszenzlicht stark vermindern. Zu diesen Effekten gehören u.a. Molekülstöße untereinander (sog. Stoßlöschen, engl. *Quenching*), Ionisation, und Prädissoziation (Zerfall des angeregten Moleküls).

Eine Berücksichtigung dieser Parameter ermöglicht es, die Besetzung $N(v_i, J_i)$ der abgefragten Schwingungs-Rotations-Zustände (charakterisiert durch die Quantenzahlen v_i bzw. J_i) im Grundzustand quantitativ zu berechnen und somit auch eine Temperatur des Gases zu bestimmen [5,9].

Die Laserstrahlen werden zur Anregung der Moleküle eingesetzt und können durch eine Zylinderoptik zu einem dünnen Lichtband mit einer Dicke von nur wenigen $100 \mu\text{m}$ und einer Breite von z.B. 30 mm geformt werden. Auf diese Weise werden die Moleküle optisch angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht. Bildet man dies auf eine Digitalkamera ab, kann ihre räumliche Verteilung registriert werden. Mit solchen bildgebenden Verfahren bei der LIF (engl. *LIF Imaging*) können räumliche Speziesverteilungen mit hoher zeitlicher Auflösung ermittelt werden, die nur durch die Pulslänge des Lasers (Femto- bis Nanosekunden) und die Belichtungsdauer der eingesetzten CCD-Kamera festgelegt ist.

6.1.2 Zweiniveaumodell der LIF

Die Fluoreszenzintensität eines durch einen kurzen Laserpuls angeregten spezifischen Molekülübergangs kann für gegebene äußere molekülspesifische und globale Parameter wie Absorptionsstärke, Gasdruck, Konzentration, Temperatur quantitativ beschrieben werden. Dies ist durch das vereinfachende Modell eines „Zweiniveausystem“ möglich (Abb. 6.2), das die Wechselwirkung Molekül-Photonen-Umgebung durch kinetische Gleichungen beschreibt [3,5]. Hierbei nimmt man an, dass das Molekül nur zwei mögliche Energiezustände (in Abb. 6.2 symbolisiert durch die horizontalen Linien 1 und 2) einnehmen kann, zwischen denen ein erlaubter optischer Übergang durch Absorption

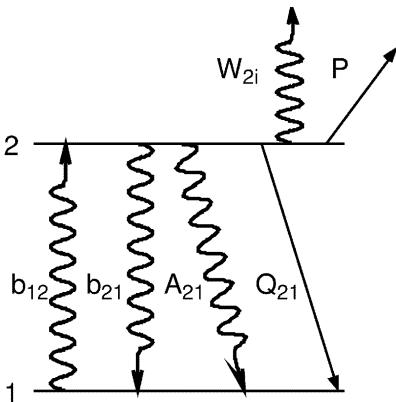


Abb. 6.2. Zweiniveaumodell der laserinduzierten Fluoreszenz. b_{12} , b_{21} , A_{21} sind Einstein-Koeffizienten für induzierte Absorption, Emmission und spontane Emision. Q_{21} , W_{2i} , P bezeichnen Rate für strahlungslose Deaktivierung, Ionisation und Prädissoziation

bzw. Emission von Licht geeigneter Wellenlänge möglich ist. Das Modell geht von folgenden Annahmen aus:

1. Keine zusätzlichen Energieniveaus im Grund- bzw. angeregten Zustand vorhanden, durch die ein Austausch von Besetzung möglich wäre. Dies ist eine starke Vereinfachung, da Moleküle zahlreiche Schwingungs-Rotations-Zustände besitzen.
2. Die Dauer des Anregungslaserpulses wird gegenüber anderen im System ablaufenden Vorgängen als klein angenommen. Damit geht man davon aus, dass die Absorption unendlich schnell erfolgt und keine weitere Wechselwirkung zwischen dem Lichtfeld des Anregungslasers und dem Molekül stattfindet. Mathematisch vereinfacht sich darüber hinaus das die Kinetik beschreibende Differentialgleichungssystem.

Nach Laseranregung erfährt die Besetzungszahl im unteren N_1 - und oberen N_2 -Anregungszustand eine zeitliche Entwicklung. Diese kann der Lösung des Differentialgleichungssystems entnommen werden [3]:

$$\frac{dN_1}{dt} = -N_1 b_{12} + N_2 (b_{21} + A_{21} + Q_{21}), \quad (6.1)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = N_1 b_{12} - N_2 (b_{21} + A_{21} + Q_{21} + P + W_{2i}). \quad (6.2)$$

Hierbei bezeichnet (Abb. 6.2) $b_{ik} = B_{ik} I_\nu / c$ die Rate (in s^{-1}) für induzierte Emission/Absorption durch das eingestrahlte Laserlicht (mit den entsprechenden Einsteinkoeffizienten B), Q_{ik} die Rate für strahlungslose, stoßinduzierte Deaktivierung („Quenching“) und W_{2i} , P die Photoionisations- bzw. Prädissoziationsrate. Auf der rechten Seite der Gleichungen (6.1) und (6.2)

stehen die Terme mit negativem bzw. positiven Vorzeichen, die die zeitliche Ent- bzw. Bevölkerung des jeweiligen Energieniveaus (linke Seite) bewirken.

Sind zudem die Prädissoziations- und Ionisationrate vernachlässigbar, so erhält man erwartungsgemäß aus der Addition und nachfolgenden zeitlichen Integration der Gleichungen die Erhaltung der Teilchenzahl, $N_1 + N_2 = \text{const.} = N_1^0$, wobei N_1^0 die Teilchenzahl im Grundzustand vor der Laseranregung bedeutet.

Unter der Annahme zeitlich stationärer Zustände ($\frac{dN_1}{dt} = \frac{dN_2}{dt} = 0$) erhält man für $0 < t < T$ (T – Pulslänge des Lasers)

$$N_2(t) = \frac{b_{12}N_1^0}{r}(1 - e^{-rt}), \quad (6.3)$$

also die exponentiell mit der Zeit zunehmende Besetzung im angeregten Niveau, die für große Zeiten ($rt \gg 1$) in den konstanten Wert

$$N_2 = \frac{b_{12}N_1^0}{r} \quad (6.4)$$

übergeht. In (6.3) bedeutet $r = b_{12} + b_{21} + A_{21} + Q_{21}$ die Summe der die Besetzung des angeregten Niveaus bestimmenden Prozessraten. Nach dem Ende des Laserpulses ($t > T$) nimmt diese Besetzung von dem Anfangswert N_2^T exponentiell mit der Zeit ab:

$$N_2(t) = N_2^T e^{-(A_{21} + Q_{21})t}. \quad (6.5)$$

Im linearen Bereich, also für Laserintensitäten, die niedrig genug sind, um keine merkliche Störung der Gleichgewichtsbesetzungen der Niveaus zu erreichen, gilt schließlich für die Fluoreszenzintensität

$$F = \frac{h\nu}{c} \frac{\Omega}{4\pi} l A N_1^0 B_{12} I_\nu \frac{A_{21}}{A_{21} + Q_{21}}, \quad (6.6)$$

d.h. man erhält die gewünschte lineare Abhängigkeit von der ungestörten Anzahl dichte N_1^0 im Grundzustand, von dem aus die Lichtanregung des Moleküls ausging. Die Zeit $\tau_{\text{tot}} = 1/(A_{21} + Q_{21})$ bedeutet dabei die effektive Lebensdauer des angeregten Zustands.

Beispiel: Bei einem Molekül kann man bei einer „Quanteneffizienz“ von 1 (d.h. keine Verminderung der nach Anregung ausgesendeten Fluoreszenzintensität durch strahlunglose Deaktivierung) $5 \cdot 10^3$ Absorptionsprozesse messen, was bei 500 nm und 1 W Strahlungsleistung ($3 \cdot 10^{18}$ Photonen/s) einer relativen Absorption von $\Delta I/I = 10^{-14}$ entspricht. Hier zeigt sich die große Empfindlichkeit der LIF gegenüber einer einfachen Absorptionsmessung, bei der man die sehr geringe Änderung der eingestrahlten Laserintensität bestimmen müsste.

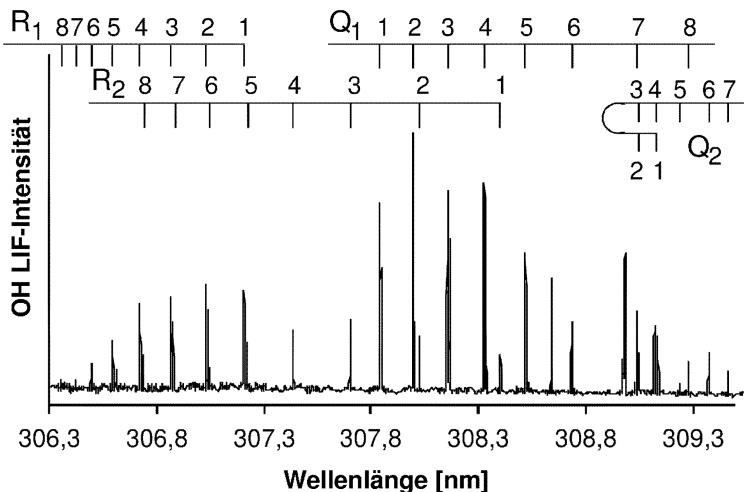


Abb. 6.3. LIF-Anregungsspektrum des OH-Radikals bei niedrigem Druck (5 mbar) unmittelbar nach der Laserphotolyse von H_2O bei 193 nm: $\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \text{OH}(v, J) + \text{H}$

Abbildung 6.3 zeigt ein LIF-Anregungsspektrum des OH-Radikals, welches aus der photoinduzierten Dissoziation von Wasserdampf in der „Reaktion“ $\text{H}_2\text{O} + h\nu (\lambda = 193 \text{ nm}) \rightarrow \text{OH}(v, J) + \text{H}$ entstanden ist. Die Strahlung zur Photolyse bei 193 nm kann ein Excimerlaser liefern. Das Spektrum erhält man, wenn man die Wellenlänge des Lasers über die Absorptionslinien des OH-Radikals abstimmt und gleichzeitig die aus allen angeregten Zuständen emittierte Fluoreszenzintensität registriert [8].

6.2 Absorptionsspektroskopie

6.2.1 Absorption und Dispersion

Licht erfährt beim Durchstrahlen einer Probe eine Schwächung aufgrund von Absorption und Streuung. Den Verlust, der sich aus diesen beiden Prozessen ergibt, nennt man *Extinktion*. Darauf hinaus ändert sich auch die Phasengeschwindigkeit des Lichts gegenüber dem Vakuum $v = c/n(\omega)$, mit dem von der Frequenz ω des Lichts abhängigen Brechungsindex n . Das klassische Modell des Brechungsindex ist das der oszillierenden elektrischen Ladung q , welche durch das elektromagnetische Feld der Lichtwelle eine Auslenkung $x(t)$ erfährt [3]. Mikroskopisch wird so ein elektrisches Dipolmoment ($q \cdot x$) erzeugt, makroskopisch durch die Anzahl N der Dipole eine Polarisation P des Mediums:

$$P = Nq \cdot x = \epsilon_0(\epsilon - 1)E = \epsilon_0\chi E \quad (6.7)$$

mit der Suszeptibilität χ des Mediums und dem Brechungsindex $n = \sqrt{\varepsilon}$. Im Allgemeinen ist der Brechungsindex eine komplexe Größe

$$n = n' - i\kappa \quad (6.8)$$

mit einem Realteil n' , der die Dispersion des Mediums beschreibt, also die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts, die sich mit der Frequenz und mit einem Absorptionskoeffizienten κ als Imaginärteil ändert.

Die Schwächung der Lichtintensität beim Durchstrahlen des Mediums in z -Richtung beschreibt das Beer-Gesetz $I(z) = I_0 \exp(-\alpha z)$, wenn I_0 die anfänglich vorhandene Intensität ist. In der Nähe eines resonanten Übergangs des Moleküls bei der Frequenz ω_0 erhält man durch Lösung der Bewegungsgleichung der erzwungenen Schwingung der (gedämpften) elektrischen Ladung für n (imaginär und real)

$$\begin{aligned} \kappa &= \frac{Nq^2}{8\varepsilon_0 m \omega_0} \frac{\gamma}{(\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma/2)^2} \\ n' &= 1 + \frac{Nq^2}{4\varepsilon_0 m \omega_0} \frac{(\omega_0 - \omega)}{(\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma/2)^2}. \end{aligned} \quad (6.9)$$

Dies stellt das Resultat für einen klassischen Oszillator dar. Die Frequenzabhängigkeit beider Anteile ist in Abb. 6.4 dargestellt. Für n' ergibt sich die Dispersionskurve, für κ eine Lorentzfunktion bei der Resonanzfrequenz ω_0 . Die Halbwertsbreite dieser „Absorptionslinie“ wird durch die Dämpfung γ des Oszillators vorgegeben. In quantenmechanischen Systemen wie z.B. Molekülen kommen viele Energieniveaus vor, zwischen denen durch Absorption erlaubte Übergänge stattfinden können. Die Oszillatorenstärke f_{ik} (Abb. 6.5) ist ein Maß für die „Stärke“ eines Übergangs vom Energieniveau i nach k , d.h. für die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül ein Photon absorbiert und einen entsprechenden Übergang in das energetisch höher gelegene Niveau k durchführt.

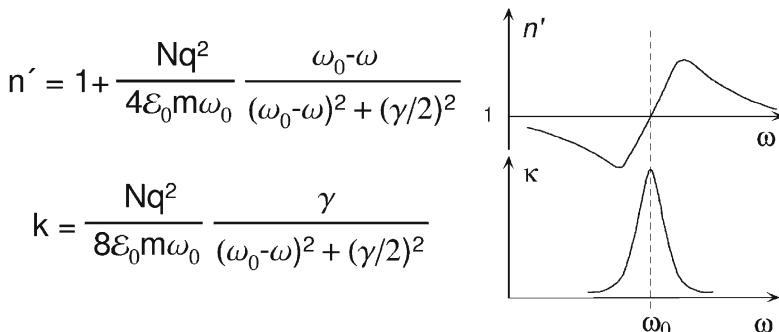


Abb. 6.4. Dispersive (oben) und absorptive (unten) Beiträge zum komplexen Brechungsindex

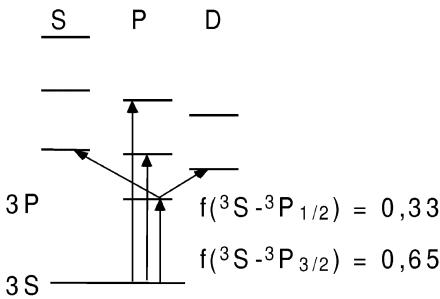


Abb. 6.5. Elektronische Übergänge beim Natriumatom [3]

gene Niveau ausführt. Dies gilt für einen nicht durch Doppler- oder Druckverbreiterung gestörten Übergang. Der integrale Absorptionskoeffizient trägt der Tatsache Rechnung, dass der Übergang eine endliche Linienbreite besitzt, also für eine gewisse Frequenzbreite eine veränderte Absorptionswahrscheinlichkeit vorherrscht. Er ist eine Konstante für den betreffenden Übergang und kann durch die Einstein-Koeffizienten ausgedrückt werden:

$$\int \alpha_{ik} d\omega = \frac{\hbar\omega_{ik}}{c} B_{ik} N_i. \quad (6.10)$$

Für den integralen Absorptionsquerschnitt ergibt sich dann mit

$$B_{ik} = \frac{\pi e^2}{2m\varepsilon_0\hbar\omega} f_{ik}, \quad (6.11)$$

$$\sigma_{\text{tot}} = \int \sigma_{ik} d\nu = \frac{\hbar\nu}{c} B_{ik}^\nu = \frac{\hbar\omega}{2\pi c} B_{ik}^\omega. \quad (6.12)$$

6.2.2 Absorptionsspektroskopie mit Lasern

Zunächst sei ein Vergleich experimenteller Methoden bei Verwendung einer inkohärenten Lichtquelle (Lampe) bzw. eines Lasers angestellt. Vorteile des Lasers:

- Wegen der hohen Monochromasie des Lasers ist keine Lichtzerlegung nötig, d.h., die gesamte Intensität der Laseremission, die allein schon durch die starke Bündelung des Laserstrahls gegenüber einer Lampe sehr viel größer ist, kann verwendet werden. Allerdings muss zur Aufnahme eines Spektrums die Laserstrahlung in ihrer Wellenlänge verändert („abgestimmt“) werden können (vgl. auch Abb. 6.6).
- Da beim Laser höhere Lichtintensitäten I vorliegen als bei einer Lampe, ist das Detektorrauschen vergleichsweise klein, so dass man kleinere Absorptionen (kleinere $\Delta I/I$) messen kann.

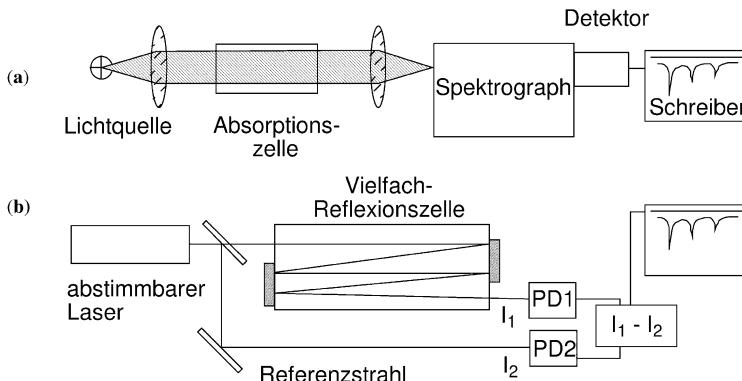


Abb. 6.6. Vergleich zwischen Absorptionsspektroskopie mit breitbandiger inkohärenter Lichtquelle (a) und mit abstimmbarem Laser (b)

- Die Linienbreite des Lasers ist meist sehr viel kleiner als die einer konventionellen Lichtquelle. Damit kann man eine höhere spektrale Auflösung im Absorptionsspektrum erreichen und dementsprechend genauere spektrale Informationen über die Moleküle erhalten.
- Höhere Empfindlichkeit durch schmalbandige Strahlung. Eine Abschätzung erhält man bei Kenntnis des Absorptionskoeffizienten α aus der Formel $\sim \alpha \delta\omega / \Delta\omega$ ($\delta\omega$ – Absorptionslinienbreite, $\Delta\omega$ – Laserbandbreite).

Abbildung 6.6 zeigt jeweils einen typischen experimentellen Aufbau zur Messung von Absorptionsspektren in Gasen unter Verwendung einer thermischen Lichtquelle (Abb. 6.6a) und eines Lasers (Abb. 6.6b) [3]. Man erkennt dort auch einen weiteren Vorteil der Laserspektroskopie: ein Laserstrahl kann aufgrund seiner geringen Divergenz leicht durch Vielfachreflexion zwischen zwei in der Gaszelle angebrachten Spiegeln einen langen Absorptionsweg im Gas zurücklegen, was die Nachweigrenze für geringe Konzentrationen erheblich verbessert. Empfindliche Absorptionsmethoden (bis zu einzelnen absorbierten Photonen) können noch relative Absorptionsen bis herunter zu $\Delta\alpha/\alpha \approx 10^{-15}$ messen!

Photoakustische Spektroskopie. Von Bell und Tyndal wurde 1881 erstmals eine Methode angegeben, mit der die Absorption von Licht in einem Gas nicht über die Intensitätsschwächung nach Austritt des Lichtstrahls aus der Probe nachgewiesen sondern „hörbar“ gemacht werden kann. Mit dieser Technik (heute Photoakustik genannt) erreicht man eine sehr hohe Empfindlichkeit zum Nachweis geringster Konzentrationen im ppb- (*parts per billion*, 10^{-9}) bis ppt- (*parts per trillion*, 10^{-12}) -Bereich. Grundlegende Voraussetzung ist allerdings, dass die nachzuweisenden Spezies sich in einer Mischung mit einem Inertgas bei höheren Drücken (ca. einige mbar bis 1 bar) in der

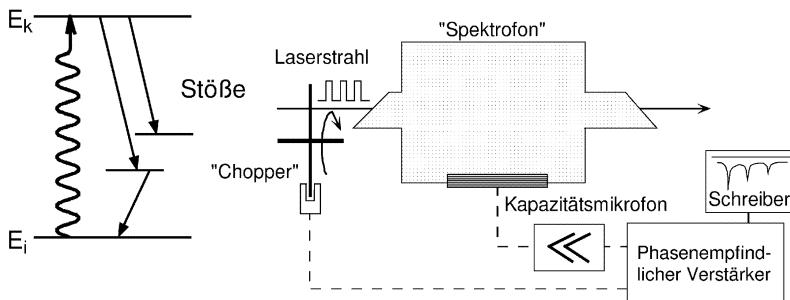


Abb. 6.7. Molekulare Vorgänge bei der photoakustischen Spektroskopie (links). Aufbau eines einfachen Spektrofons (rechts)

Probe befinden. Daher ist, solange keine Überlappungen der druckverbreiterten Absorptionsspektren verschiedener Molekülsorten auftreten, die photoakustische Spektroskopie besonders in der Umweltanalytik interessant [1, 3, 6].

Die Verhältnisse bei der Photoakustik sind in Abb. 6.7 skizziert. Durch Absorption von zeitlich gepulstem Laserlicht (wellenförmiger Pfeil im Energieniveauschema links) gelangt das Molekül in einen zeitlich instabilen angeregten Zustand. Finden während der Lebensdauer dieses Zustands zwischenmolekulare Stöße mit anderen Molekülen oder Atomen in der Probe statt, so kann eine nachfolgende Stoßdeaktivierung das Molekül ohne Aussendung von Strahlung wieder in den Grundzustand übergehen (gerade Pfeile im Energieniveauschema). Bei einem Druck von 1 mbar erfolgt diese strahlungslose Deaktivierung (engl. *Quenching*) in ca. 10^{-5} s. Die anfänglich absorbierte Energie wird adiabatisch in thermische Bewegungsenergie umgewandelt und führt zur Ausbreitung einer Druckwelle, die mit einem empfindlichen Mikrofon nachgewiesen werden kann. Relative Druckänderungen von 10^{-7} können so zeitaufgelöst registriert werden. Da der Nachweis auf der strahlungslosen Deaktivierung beruht, eignet sich die Methode auch gut für Substanzen mit geringer Fluoreszenzquantenausbeute. Ein Nachteil der photoakustischen Spektroskopie ist, dass die erzielbare spektrale Auflösung durch Druck- und Dopplerverbreiterung begrenzt wird. Die Empfindlichkeit kann durch resonante Verstärkung der Druckwelle erhöht werden, die durch die Relaxation der Molekülärregung hervorgerufen wurde, indem die Pulsfolge (bei gepulstem Laserbetrieb) bzw. die durch den Lichtzerhacker („Chopper“) in Abb. 6.7 periodisch unterbrochene kontinuierliche Intensität des Lasers bei den Eigenfrequenzen der Messzelle betrieben wird. Dann wirkt die Zelle, ähnlich wie der Korpus einer Gitarre, als Resonanzverstärker der akustischen Welle.

Beispiele:

1. Das NO-Molekül absorbiert bei seiner Grundschwingungsfrequenz von 1876 cm^{-1} . Durch Einstrahlung in die Gaszelle mit einem entsprechend abgestimmten Infrarotlaser kann man eine Nachweisempfindlichkeit von 0,4 ppb erzielen.
2. Messung der Dissoziationsenergie von Molekülen: die Amplitude des optoakustischen Signals fällt drastisch ab, wenn man die Wellenlänge des Anregungslasers so wählt, dass das Molekül gerade dissoziiert: dann steht keine kinetische Energie mehr zur Umwandlung in thermische Energie im Stoßgas zur Verfügung, da die absorbierte Energie zur Trennung der Molekülfragmente verbraucht wurde, vorausgesetzt, die Energie der Photonen „reicht gerade“ für den Bindungsbruch aus.

Intracavity Absorption. Eine ebenfalls sehr empfindliche Absorptionsmethode mit Lasern ist die Intracavity-Absorption. Im Normalbetrieb ist die Verstärkung G_0 des Lasermediums nur wenig größer als die Schwelle, die durch die internen Verluste im Inneren des Resonators hervorgerufen werden. Stellt man nun eine Zelle in den Resonator, der ein die Laserstrahlung absorbierendes Gas enthält, so erhöht man dadurch die internen Verluste, und schon bei geringsten Konzentrationen nimmt die hinter dem Auskoppelspiegel gemessene Laserstrahlung bei den entsprechenden Absorptionslinien des Gases ab. Eine Zerlegung des aus dem Resonator austretenden Laserlichts in einem Spektrometer liefert somit ein Absorptionsspektrum des Gases welches sich in der „intracavity-Gaszelle“ befindet [3, 4]. Vorteile der Intracavity-Absorptions-Methode:

- Bei einem Transmissionsvermögen T_2 des Auskoppelspiegels ist die Intensität innerhalb des Resonators $q = 1/T_2$ -mal größer als außerhalb (für $T_2 \approx 0,02 \text{ s}$ ergibt sich $q \approx 50$).
- Die Intensität des Laserstrahls außerhalb des Resonators ist sehr von den Verlusten innerhalb des Resonators abhängig. Daher können sehr schwache Absorptionsübergänge spektroskopiert werden, besonders wenn der Laser knapp über der Schwelle zum Verlöschen gepumpt wird. Die relative Änderung der am Ausgang mit einem Detektor gemessenen Strahlungsleistung P ist gegeben durch [3]

$$\Delta P/P = \Delta I/I = \frac{G_0}{G_0 - \gamma} \frac{\Delta \gamma}{\Delta \gamma + \gamma}. \quad (6.13)$$

Hierbei sind P die Lichtleistung, I die Intensität, $\Delta \gamma = \alpha(\omega)L$ bezeichnet zusätzliche Verluste durch das absorbierende Medium in der Zelle der Länge L im Resonator und $\alpha(\omega)$ den Absorptionskoeffizient des Gases bei der Frequenz ω .

- Das Laserlicht läuft während des optischen Pumpvorgangs im Lasermedium vielfach zwischen den Resonatorspiegeln hin und her. Der effektive Absorptionsweg, den das Licht also innerhalb der absorbierenden

Probe zurücklegt, ist beträchtlich (mehrere km!) und wird durch die Einschwingzeit des Resonatormode bestimmt.

Cavity-Ringdown-Spektroskopie. Vom Grundgedanken ähnlich, jedoch mit prinzipiellen Unterschieden zur Intracavity-Absorptions-Spektroskopie, arbeitet die Cavity-Ringdown-Spektroskopie (CRDS) [2, 10, 13]. Bei der CRDS befindet sich die absorbierende Probe – außerhalb vom Laser – im Inneren eines optischen Resonators. Dieser besteht aus zwei Hohlspiegeln, die im Bereich der optischen Übergänge der zu untersuchenden Spezies hoch reflektieren. Ein kurzer Laserpuls wird durch den einen Spiegel auf der optischen Achse in den Grundmode des Resonators eingekoppelt, und die geringe, bei jedem Umlauf aus dem anderen Spiegel austretende Lichtintensität wird zeitaufgelöst mit einem schnellen Detektor gemessen. Wegen der hohen Reflexivität der Spiegel, die im sichtbaren Spektralbereich mehr 99,99% betragen kann, läuft der Laserstrahl sehr oft im Resonator um und kann daher einen großen effektiven Absorptionsweg (mehrere km!) zurücklegen. Meist ist der Spiegelabstand L gerade so groß, dass die aufeinanderfolgend austretenden Lichtpulse sich lückenlos aneinanderreihen, so dass man eine glatte, exponentiell abklingende Lichtintensität aufzeichnen kann (bei einem 8 ns langen Laserpuls also ca. $L = 0,6 \text{ m}$). Das zeitliche Abklingen der Intensität ist ein Maß für die Stärke der Absorption, also der absoluten Konzentration der nachzuweisenden Spezies im Resonator. Andere Verluste, wie die Streuung des Laserlichts im Gas, an den Spiegeloberflächen usw., bilden den Rauschhintergrund des Signals und werden im leeren Resonator bestimmt (bzw. wenn der Laser neben die Absorptionslinie abgestimmt wird). Neben der sehr hohen Empfindlichkeit dieser Absorptionsmethode hat man hier den Vorteil, dass nicht absolute Intensitäten, sondern nur das zeitliche Abklingen einer Intensität in die Messung eingeht. Daher ist die CRDS unempfindlich gegen Puls-zu-Puls-Schwankungen der Laserintensität. Zur Aufnahme eines Spektrums der absorbierenden Probe muss der Laser in dem interessierenden Wellenlängenbereich durchgestimmt werden.

Beispiele:

- Molekularer Sauerstoff besitzt einen schwachen, mit einer Änderung des magnetischen Dipols verbundenen Übergang, der im Spektralbereich (dem sog. „roten atmosphärischen System“) bei 610 nm liegt. Ein CRDS-Spektrometer ist in der Lage, bei diesem Übergang das im Sauerstoff von Raumluft zu 0,2% enthaltene Isotop $^{18}\text{O}_2$ (ca. 0,8 ppm) nachzuweisen.
- Auch der 5. Oberton in der ν_3 -Schwingung des N_2O -Moleküls ist sehr schwach (ein Photon bewirkt einen Übergang vom Schwingungsgrundzustand in das Schwingungsniveau $v = 6$). Mit der CRDS können trotzdem Spektren bei 775,3 nm mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mehr als 100 aufgenommen werden. Die Nachweisgrenze liegt etwa bei $2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1}$ [11].

Dopplerfreie Absorptionsspektroskopie mit Lasern. Zur Strukturaufklärung von mehratomigen Molekülen will man häufig die durch schnelle thermische Bewegung der Moleküle (Dopplereffekt) hervorgerufene Linienverbreiterung vermeiden. Wenn das gelingt, hat man es bei stabilen Molekülen nur noch mit der natürlichen und der durch zwischenmolekulare Stöße verursachten Linienbreite zu tun; letztere kann durch Reduzierung des Gasdrucks noch weiter vermindert werden.

Zur Reduzierung der Dopplerverbreiterung sollten nur Moleküle mit einer Geschwindigkeitskomponente Δv_x um $v_x = 0$ beobachtet werden, wenn x die Richtung der Achse zwischen dem Licht absorbierenden/emittierendem Molekül und dem Beobachter (Detektor) bezeichnet. Zwei experimentelle Möglichkeiten zur Reduzierung der Dopplerverbreiterung sollen hier besprochen werden.

1. Man kann die Geschwindigkeitskomponente v_x verkleinern. Um eine solche Reduktion zu erreichen, verwendet man einen sogenannten Molekularstrahl: Dies ist ein kollimierter Teilchenstrahl, der aus den zu untersuchenden Molekülen in hoher Verdünnung mit einem inerten Gas besteht und der aus einer kleinen Öffnung (z.B. $80\text{ }\mu\text{m}$) eines Behälters unter Atmosphärendruck ins Vakuum austritt (Abb. 6.8). Bedingt durch den gerichteten Impulsübertrag innerhalb der Austrittsöffnung und einer Blende werden Moleküle selektiert, die eine starke Abkühlung ihrer inneren Freiheitsgrade (Schwingung, Rotation) erfahren haben. Sie fliegen in einem gebündelten Strahl mit einer Geschwindigkeitsverteilung, deren

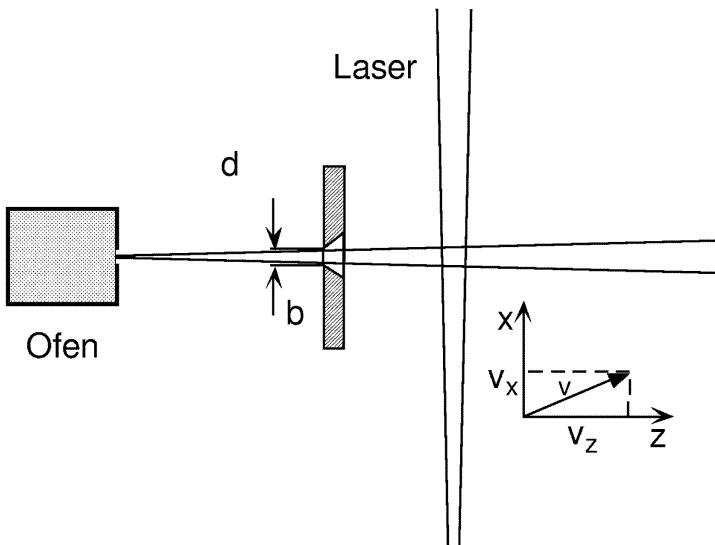


Abb. 6.8. Molekularstrahl zur Reduzierung der Dopplerverbreiterung von Spektallinien

Komponenten senkrecht zur Ausbreitungsrichtung stark reduziert sind. Das Verhältnis der Geschwindigkeitskomponenten in Strahlrichtung (z -Achse in Abb. 6.8) und senkrecht dazu ist näherungsweise durch $v_x/v_z = b/2d$ gegeben, wobei b die Schlitzbreite und d den Abstand zwischen Quelle und Düse bezeichnen. Nur die Moleküle aus der Maxwell-Boltzmann-Verteilung [7] mit der kleinen Geschwindigkeitskomponente v_x in x -Richtung kommen durch die Blende. Ihre Vorzugsgeschwindigkeit v_z zu einem senkrecht dazu eingekoppelten Laserstrahl wird durch die räumliche Kollimierung festgelegt, so dass diese Komponente ohne Auswirkung auf das Absorptions- oder Emissionsprofil ist.

2. Man präpariert („markiert“) mit Laserstrahlung nur eine Geschwindigkeitsgruppe aus dem Ensemble der Moleküle, deren Geschwindigkeitsbeträge bei der Temperatur T einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung gehorchen. Dies gelingt mit Hilfe der Zweiphotonenabsorption [3, 14]. Abbildung 6.9 veranschaulicht die Vorgänge an einem Dreiniveausystem eines Atoms/Moleküls. Bei höheren Intensitäten des anregenden Laserstrahls absorbieren die Moleküle mit größerer Wahrscheinlichkeit gleichzeitig zwei (oder mehr) Photonen und werden vom Energieniveau i nach f angeregt. Von dort können sie Fluoreszenzstrahlung aussenden (z.B. beim Übergang ins Niveau m). Für ein ruhendes Molekül gilt die Energiebilanz mit dem Strahlungsfeld

$$E_f - E_i = \hbar(\omega_1 + \omega_2). \quad (6.14)$$

Dabei sind ω_1 und ω_2 die Frequenzen des eingestrahlten Laserlichts ($\omega_1 = \omega_2$ bei Verwendung von nur einem Laser). Ein mit der Geschwindigkeit \mathbf{v} bewegtes Molekül „sieht“ dagegen die verschobene Lichtfrequenz $\omega' = \omega - \mathbf{k} \cdot \mathbf{v}$, wenn \mathbf{k} den Wellenvektor des Lichts (parallel zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls mit $|\mathbf{k}| = 2\pi/\lambda$) bezeichnet. Überlagert man nun zwei gegenläufige Laserstrahlen in der Probe, so lautet die Resonanzbedingung

$$E_f - E_i = \hbar(\omega_1 + \omega_2) - \hbar\mathbf{v}(\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2). \quad (6.15)$$

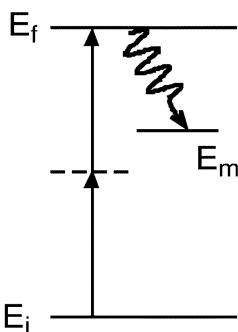


Abb. 6.9. Energieniveauschema der Zweiphotonenabsorption mit nachfolgender Fluoreszenzemission

Für $\mathbf{k}_1 = -\mathbf{k}_2$ aus unserem Beispiel wird dann die Dopplerverschiebung zu Null, und alle Moleküle können unabhängig von ihrer Geschwindigkeit Photonen aus beiden Laserstrahlen absorbieren und den Zweiphotonenübergang ausführen. Nur diese Moleküle lassen sich über die nachfolgende Fluoreszenzstrahlung nachweisen, die dann ein weitgehend dopplervorbreitertes Linienprofil aufweist.

Es kann aber auch sein, dass Moleküle aus einer spezifischen Geschwindigkeitsklasse, die obige Resonanzbedingung erfüllt, zwei Photonen aus nur einem Strahl absorbieren, was zu einem dopplervorbreiterteren Untergrund im Fluoreszenzsignal führt.

Für beide dopplervorbreiternde Spektroskopiemethoden benötigt man zur Auflösung der sehr schmalen Linienformen Laserstrahlung mit entsprechend geringer Linienbreite, wie sie mit Einmodenlasern zur Verfügung stehen [3, 12].

Literatur

1. Bijnen FGC, Harren FJM, Hackstein JHP, Reuss J (1996) Intracavity CO laser photoacoustic trace gas detection: cyclic CH₄, H₂O and CO₂ emission by cockroaches and scarab beetles. *Appl Opt* 35:5357–5368
2. Busch KW, Busch MA (1999) Cavity-ringdown spectroscopy. (ACS Symposium Series 720) Am Chem Soc, Washington
3. Demtröder W (2000) Laserspektroskopie. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
4. Derzy I, Lozovsky VA, Ditzian N, Rahinov I, Cheskis S (2000) *Proc Combust Inst* 28:1741
5. Eckbreth AC (1988) Laser diagnostics for combustion temperature and species. Abacus Press, Tunbridge Wells
6. Gondal MA (1997) Laser photoacoustic spectrometer for remote monitoring of atmospheric pollutants. *Appl Opt* 36:3195–3201
7. Haken H, Wolf HC (1992) Molekülephysik und Quantenchemie. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
8. Jacobs A, Wahl M, Weller R, Wolfrum J (1987) Rotational distribution of nascent OH radicals after H₂O₂ photolysis at 193 nm. *Appl Phys B* 42:173–179
9. Kohse-Höinghaus K, Jeffries JB (Eds) (2002) Applied combustion diagnostics. Taylor and Francis, New York
10. McIllroy A, Jeffries JB (2002) Cavity ringdown spectroscopy for concentration measurements. In: Kohse-Höinghaus K, Jeffries JB (Eds) Applied combustion diagnostics. Taylor and Francis, New York
11. Romanini D, Kachanov AA, Stoeckel F (1997) Diode laser cavity ring down spectroscopy. *Chem Phys Lett* 270:538–545
12. Saleh BEA, Teich MC (1991) Fundamentals of photonics. Wiley, New York
13. Scherer JJ, Paul JB, O'Keefe A, Saykally RJ (1997) Cavity ringdown laser absorption spectroscopy: history, development, and application to pulsed molecular beams. *Chem Rev* 97:25–52
14. Steinfeld JI (1993) Molecules and radiation. MIT Press, Cambridge

7 Nichtlineare Laserspektroskopiemethoden

T. Dreier

7.1 Die nichtlineare Wechselwirkung von quantenmechanischen Systemen mit Licht

Von den zahlreichen Phänomenen der Wechselwirkung von Photonen mit Materie bei hohen Lichtintensitäten seien hier nur zwei Klassen herausgegriffen: die durch den Raman-Effekt [4] bzw. Absorptionsvorgänge [1,4] hervorgerufenen Effekte höherer Ordnung.

7.1.1 Nichtlineare Raman-Prozesse

Im Allgemeinen wird das elektrische Dipolmoment in einem molekularen System von linearen und nichtlinearen Termen bestimmt:

$$\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E} + \frac{1}{2} \beta \mathbf{E} \mathbf{E} + \frac{1}{6} \gamma \mathbf{E} \mathbf{E} \mathbf{E} + \dots \quad (7.1)$$

Dabei bedeutet α die Polarisierbarkeit, β die Hyperpolarisierbarkeit und γ die 2. Hyperpolarisierbarkeit des Mediums. Da diese Größen i. Allg. noch von den Richtungen der Polarisationsebenen der eingestrahlten Lichtfelder abhängen, stellen sie Tensoren vom Rang 2, 3, bzw. 4 dar. Bei hohen Lichtintensitäten liefern die Terme mit β und γ merkliche Beiträge zu einer großen Vielfalt optischer Phänomene wie Frequenzverdopplung, Frequenzverdreifachung, und zu der hier zu besprechenden nichtlinearen Raman-Spektroskopie. Gleichbedeutend mit diesem Ansatz ist die Entwicklung der makroskopischen Polarisierung nach Potenzen der elektrischen Feldstärken der einfallenden Laserstrahlen bei den Frequenzen ω_i [2,3,5]:

$$\mathbf{P} = \chi^{(1)} \mathbf{E}_1 + \frac{1}{2} \chi^{(2)} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 + \frac{1}{6} \chi^{(3)} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \mathbf{E}_3 + \dots \quad (7.2)$$

Hierbei bedeuten $\chi^{(i)}$ die Suszeptibilitäten der i . Ordnung. Für die bekannten linearen Phänomene Effekte, Emission, spontane Raman-Streuung usw. ist $\chi^{(1)}$ verantwortlich, für die uns im Weiteren interessierenden nichtlinearen Prozesse in Gasen muss der Term mit $\chi^{(3)}$ eine nennenswerte Größe erreichen.

Es gibt zahlreiche Varianten nichtlinearer Raman-Prozesse; schematisch sind einige in Abb. 7.1 dargestellt.

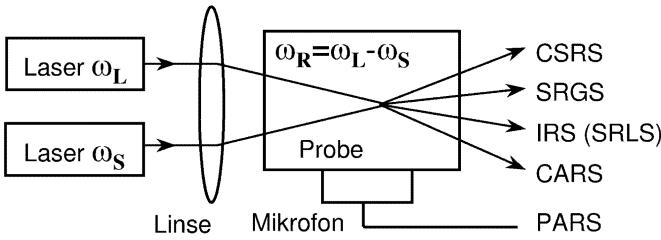


Abb. 7.1. Stimulierte Raman-Streuung (SRS)

Stimulierte Raman-Streuung (SRS). Die stimulierte Raman-Streuung wird anhand des Energieniveaudiagramms von Abb. 7.2 erläutert: strahlt man gleichzeitig Photonen bei der Frequenz ω_L und ω_S in eine Probe, die Moleküle mit einer Raman aktiven Schwingung (Rotation) bei ω_R enthält, so kann durch den gezeichneten stimulierten Wechselwirkungsprozess ein weiteres „Stokes“-Photon erzeugt und das Molekül dabei in den schwingungs- (rotations-)angeregten Zustand übergehen. Der nichtlineare Polarisationsterm für diesen Prozess lautet:

$$\mathbf{P}^{(3)}(\omega_S) = \frac{6}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)}(-\omega_S; \omega_L, -\omega_L, \omega_S) |\mathbf{E}(\omega_L)|^2 \mathbf{E}(\omega_S). \quad (7.3)$$

Durch Abstimmen des Stokes-Lasers erhält man ein SRS-Spektrum mit den Raman-Resonanzen $\omega_R = \omega_L - \omega_S$.

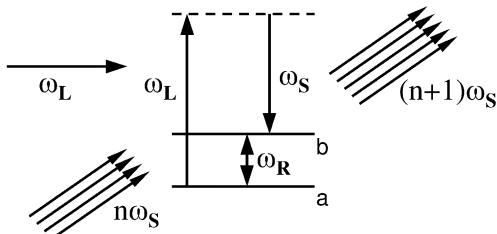


Abb. 7.2. Erzeugung von Stokes-Photonen durch stimulierte Raman-Streuung

Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (CARS).

CARS-Signal. Man kann auch die Anti-Stokes-Frequenz $2\omega_p - \omega_s = \omega_{as}$ erhalten, wobei $\omega_R = \omega_{ab}$ (Abb. 7.3) die Frequenz eines Raman aktiven Schwingungs-(Rotations-)Übergangs bedeuten. Die erzeugte Welle resultiert aus der inelastischen Streuung der Pumpwelle (ω_p) an der durch Pump-

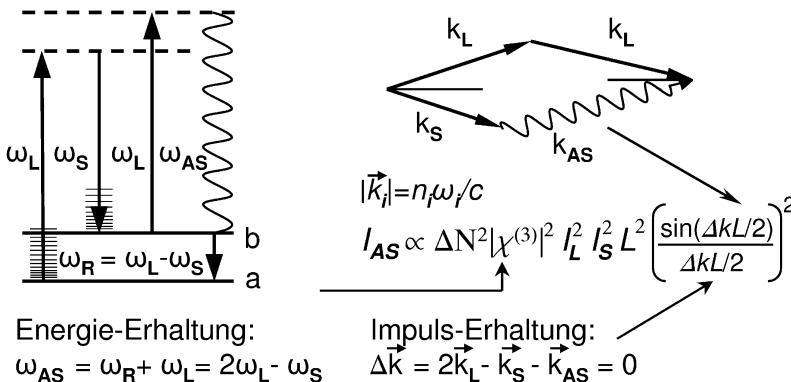


Abb. 7.3. Energieniveaudiagramm und Strahlanordnung bei CARS

und Stokes-Welle erzeugten Polarisation bei der Differenzfrequenz ω_R , die mit der Raman-Frequenz des Molekülensembles übereinstimmt. Über diese Modulation koppelt eine weitere Welle bei der Frequenz ω_p so in einem Vierwellenwechselwirkungsprozess eine Anti-Stokes-Welle bei der Frequenz $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$ erzeugt wird. Da jedes Medium Dispersion aufweist und die Impulserhaltung für alle beteiligten Photonen gelten muss, wird das CARS Signal in die durch

$$\sum_i k_i = 0 \quad (7.4)$$

festgelegte Richtung abgestrahlt. Nur dann wird über einen makroskopischen Bereich in der Probe (das ist der räumliche Bereich, in dem Pump- und Stokes-Laser überlagern) effizient ein CARS Signal erzeugt. Die Verhältnisse in einem Energieniveaudiagramm des Moleküls und anhand der Wellenvektoren der eingebrachten Laserstrahlen zeigt Abb. 7.3.

Verläuft der Streuprozess über eine Raman aktive Molekülrotation (Rotations-CARS), gelten die Auswahlregeln $\Delta v = 0$, $\Delta J = \pm 2$. Für einen gleichzeitigen Schwingungsübergang des Moleküls (Vibrations-Rotations-CARS) erhält man dagegen aus quantenmechanischen Berechnungen, dass nur Übergänge mit $\Delta v = \pm 1$, $\Delta J = 0, \pm 2$ erlaubt sind und damit ein resonantes CARS-Signal liefern. Die spektroskopische Nomenklatur bezeichnet dabei Übergänge mit $\Delta J = -2, 0, +2$ als *O*-, *Q*- bzw. *S*-Zweige.

Ein Beispiel für ein berechnetes Schwingungs-Rotations-CARS-Spektrum von Wasser zeigt Abb. 7.4. Die Theorie zur Berechnung der CARS-Intensität ist in vielen Publikationen beschrieben [2, 5]. Aus dem klassischen Ansatz für die nichtlineare Polarisation $P^{(3)}(r, \omega_{as})$ bei der erzeugten Anti-Stokes-Frequenz

$$\mathbf{P}^{(3)}(r, \omega_{as}) = \frac{1}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)}(-\omega_{as}; \omega_L, \omega_L, -\omega_S) \mathbf{E}^2(r, \omega_L) \mathbf{E}^*(r, \omega_S) \quad (7.5)$$

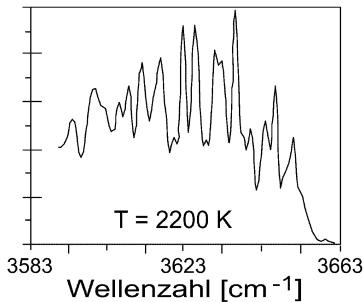


Abb. 7.4. Berechnetes CARS-Spektrum von Wasser für eine Temperatur von 2200 K. Man erkennt die zahlreichen Überlagerungen der Schwingungs-Rotations-Linien der ($v = 0, 1$) Q -Zweig ($\Delta J = 0$)-Übergänge [2]

mit dem Suszeptibilitätstensor $\chi^{(3)}$, dessen Elemente von den beteiligten Frequenzen ω_i sowie den molekularen Parametern des untersuchten Moleküls nach (7.6) abhängen,

$$\chi^{(3)}(\omega_{as}) = \chi_{nr} + \frac{2Nc^4}{h\omega_s^4} \frac{d\sigma}{d\Omega} \Delta_{ab} \frac{\omega_{ab}}{\omega_{ab}^2 - (\omega_p - \omega_s)^2 - i\Gamma_{ab}(\omega_p - \omega_s)}, \quad (7.6)$$

erhält man schließlich für die CARS-Intensität den Ausdruck

$$I_{as} = \frac{16\pi^4 \omega_{as}^2}{c^4 n_p^2 n_s n_{as}} \left| \chi^{(3)} \right|^2 I_L^2 I_S L^2 \left(\frac{\sin \delta k L / 2}{\delta k L / 2} \right)^2. \quad (7.7)$$

Somit hängt die im Spektrum beobachtete Intensität von folgenden Größen ab:

1. $|\chi^{(3)}|^2$: molekülspezifisch; quadratisch abhängig von der Besetzungsdi- fferenz, $\Delta N = N_b - N_a$, zwischen unterem und oberem Energieniveau des erlaubten Raman-Übergangs.
2. $I_p^2 I_s$: ($I \sim |E|^2$): starke Abhängigkeit der Signalintensität von den Inten- sitäten von Pump- und Stokes-Laser.

Signalaufnahmetechniken und Versuchsaufbau. Man unterscheidet prinzipiell zwei Arten von CARS-Spektroskopie, je nachdem, ob der Stokes-Laser schmalbandig oder breitbandig ausgelegt ist. Im ersten Fall (Scanning CARS) wird das CARS-Spektrum durch Abstimmen dieses Lasers über die Raman-Resonanzen erzeugt (Abb. 7.5a). Im zweiten Fall ist die Bandbreite des Lasers groß genug, um gleichzeitig alle Raman-Resonanzen anzuregen und somit das CARS-Spektrum durch Dispersion in einem Spektrometer und Detektion mit einer CCD-Kamera im Prinzip innerhalb eines Laserpulses zu erhalten (Abb. 7.5b).

Abbildung 7.6 zeigt schematisch einen typischen Aufbau zur Aufnahme von CARS-Spektren. Als Laserquelle für den Pumpstrahl (bei ω_L) dient ein

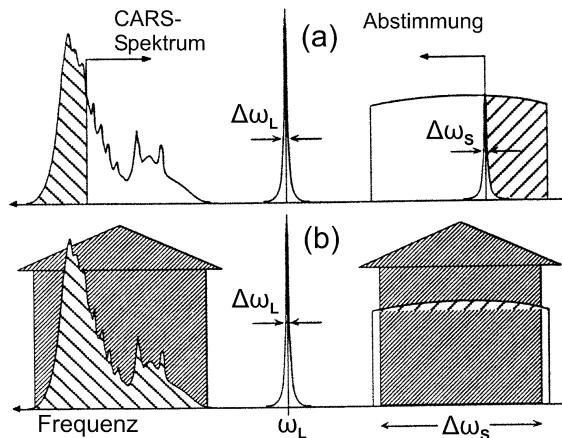


Abb. 7.5. Aufnahme eines CARS-Spektrums durch (a) Abstimmen eines schmalbandigen und (b) eines breitbandigen Stokes-Lasers

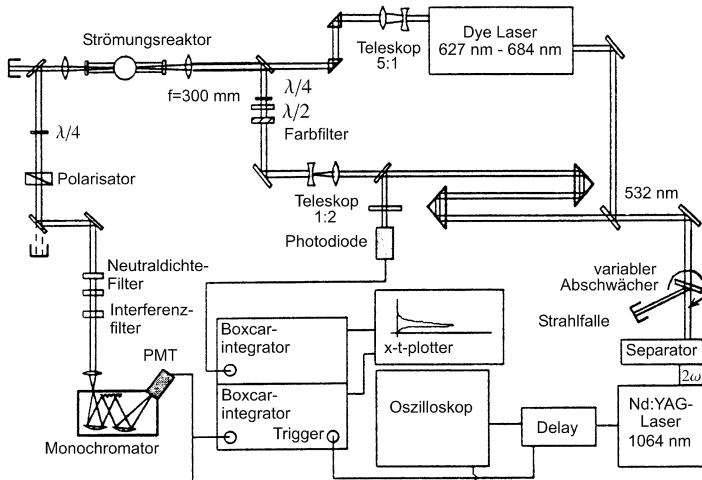


Abb. 7.6. Scanning-CARS-Spektrometer, bestehend aus Nd:YAG-Laser (Pump-laser) und einem abstimmbaren Farbstofflaser (Stokes-Laser). In der gezeigten Anordnung können Moleküle in einem Strömungssystem bei niedrigem Druck (< 10 mbar) spektroskopiert werden

Nd:YAG-Laser, der gleichzeitig auch einen Farbstofflaser (Stokes-Laser, bei ω_S) optisch pumpt. Die Strahlen werden je nach gewählter Phasenansetzungsgeometrie durch Spiegel und Strahlteiler kombiniert und im Messort mit einer Linse fokussiert. Das erzeugte CARS-Signal wird zunächst durch Farbteilerspiegel von den restlichen Laserstrahlen getrennt und anschließend in einem Monochromator detektiert.

Anwendungen der CARS-Spektroskopie

1. *Thermometrie.* Der wichtigste Anwendungsbereich der CARS-Spektroskopie liegt auf dem Gebiet der optischen In-situ-Temperaturbestimmung in der Gasphase (Flammen, chemische Reaktoren, etc.). In luftbetriebenen Verbrennungsprozessen (Gasbrenner, Motoren, Triebwerke) kann so berührungslos mit einem einzigen Laserpuls sehr kurzer Pulsdauer (10 ns) die Temperatur anhand des Schwingungs-Rotations-CARS-Spektrums etwa von molekularem Stickstoff bestimmt werden. Dessen spektrale Form ändert sich charakteristisch und empfindlich mit der Temperatur des Gases. Abbildung 7.7 zeigt dies am Beispiel von Stickstoff.
2. *Spektroskopie/Konzentrationsmessung.* Die Anwendungen kohärenter Raman-Techniken in der Spektroskopie sind sehr vielfältig. Speziell durch die hohe Sammeleffizienz der Signalphotonen besitzt die CARS-Spektroskopie eine gegenüber der spontanen Raman-Streuung höhere Nachweisempfindlichkeit im Einzelpulsverfahren und kann daher besonders für zeitlich schnell veränderliche chemisch-physikalische Vorgänge eingesetzt werden: Speziesnachweis in turbulenten Stömungen, Photolysereaktionen, schnelle Isomerisierungsreaktionen usw. Zudem wird die spektrale Auflösung bei CARS hauptsächlich nur durch die Linienbreite der verwendeten Laserstrahlung begrenzt (diese kann $< 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ sein).

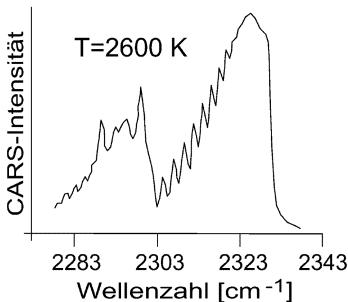


Abb. 7.7. CARS-Spektrum von molekularem Stickstoff, aufgenommen in einer Acetylen-Sauerstoff-Flamme. Man erkennt deutlich die ($v = 0, 1$) Q-Zweige. Aus [2]

7.2 Nichtlineare Absorptionsspektroskopie

Wechselwirkungen von mehreren Laserstrahlen mit atomaren/molekularen optischen Absorptionsübergängen führen ebenfalls zu kohärent erzeugten Signalstrahlen, deren frequenzabhängige Intensität spektroskopische Informationen über die untersuchte Spezies erlaubt.

7.2.1 DFWM

Bei der Entarteten Vierwellenmischung (engl.: degenerate four-wave mixing, DFWM [2]) findet eine verstärkte Wechselwirkung von drei sich kreuzenden Laserstrahlen mit dem Molekülensemble und damit eine Signalstrahlerzeugung statt, wenn die eingestrahlte Frequenz einem Absorptionsübergang entspricht (Abb. 7.8). Wegen der Gleichheit der Frequenzen ist die Phasenanzapfungsbedingung im Prinzip für jeden Kreuzungswinkel der Strahlen zu erfüllen, und der experimentelle Aufwand – da nur ein Laser benötigt wird – entsprechend geringer. Auch hier wird der Signalstrahl in die durch $\Delta\mathbf{k} = 0$ festgelegte Richtung erzeugt. Experimentell besonders einfach zu verwirklichen ist die hier gezeigte, als Phasenkonjugation bezeichnete Strahlanordnung, die durch Rückreflexion eines Pumpstrahls (Wellenvektor \mathbf{k}_{p1}) in sich selbst und daher Abspaltung des Signalstrahls durch einen Strahltreiber entsteht. Den zurückreflektierten Strahl bezeichnet man als Probestrahl.

Vorteile von DFWM

- Höhere Empfindlichkeit, da die Methode einen voll resonanten Wechselwirkungsprozess darstellt. Damit ist ein Nachweis von instabilen Molekülen (Radikale) geringer Konzentration möglich.
- Doppler-freie Spektroskopie: in der Strahlanordnung nach Abb. 7.8 absorbieren nur diejenigen Moleküle aus der Maxwell-Verteilung Strahlung von *beiden* Pumpstrahlen – und liefern damit einen Signalbeitrag –, die sich in Ruhe befinden oder senkrecht zum Strahl bewegen.
- Entfernter Nachweis durch kohärente Signalstrahl.

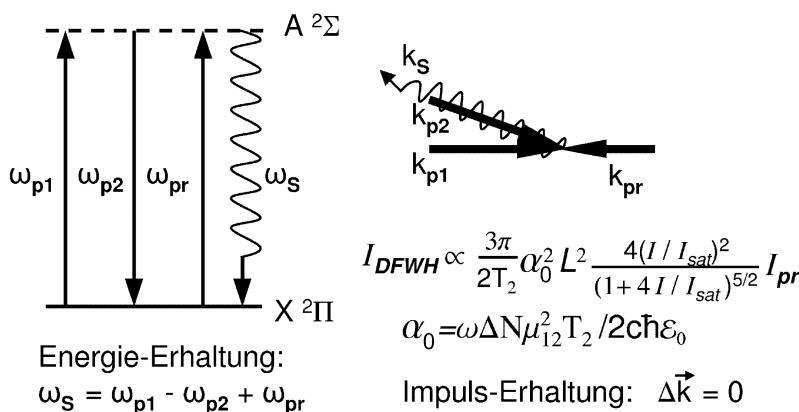


Abb. 7.8. DFWM-Spektroskopie: Energieniveaudiagramm und phasenkonjugierende Strahlanordnung für einen elektronischen $A^2\Sigma-X^2\Pi$ -Übergang. T_2 Dephasingzeit, α_0 Absorptionskoeffizient in der Linienmitte, L Wechselwirkungslänge im Überlagerungsvolumen, I_{sat} Sättigungsintensität

Wie bei CARS kann man auch hier durch Verwendung von Laserstrahlen mit großer Bandbreite ($\Delta\omega \sim 100 \text{ cm}^{-1}$) und anschließende Dispersion in einem Spektrometer DFWM-Spektren im Einzelpulsverfahren gewinnen. *Vorteil:* hohe zeitliche Auflösung, gegeben durch die ca. 10 ns Pulslänge des Lasers.

Anwendungen

- Thermometrie,
- Piko-/Femtosekundenkinetik in Flüssigkeiten und Festkörpern.

Aus einem einfachen Modell (stationäre Atome, sättigende Pumpstrahlen, Intensitätsschwacher Probestrahl, phasenkonjugierende Strahlanordnung) erhält man die Formel (7.8) für die DFWM-Signalintensität [2]:

$$I_{\text{DFWM}} = \frac{\alpha_0^2 L^2}{(1 + \delta^2)} \frac{4I^2/I_{\text{sat}}^2}{(1 + 4I^2/I_{\text{sat}}^2)^3} I_3 \quad (7.8)$$

mit

$$\delta = (\omega - \omega_0)T_2, \quad \alpha_0 = \frac{\mu^2 \Delta N_0 k T_2}{2 \varepsilon_0 \hbar}, \quad I_{\text{sat}} = \frac{c \varepsilon_0 \hbar^2}{2 T_1 T_2 \mu^2}. \quad (7.9)$$

Darin bedeuten δ die Abstimmung von der Linienmitte bei ω_0 , α_0 der Absorptionskoeffizienten (normiert mit der Dephasierungszeit T_2) in der Linienmitte bei ω_0 , ΔN_0 , die Besetzungszahldifferenz zwischen unterem und oberen Energieniveaus des Übergangs (Abb. 7.9) und I_{sat} die Sättigungsintensität.

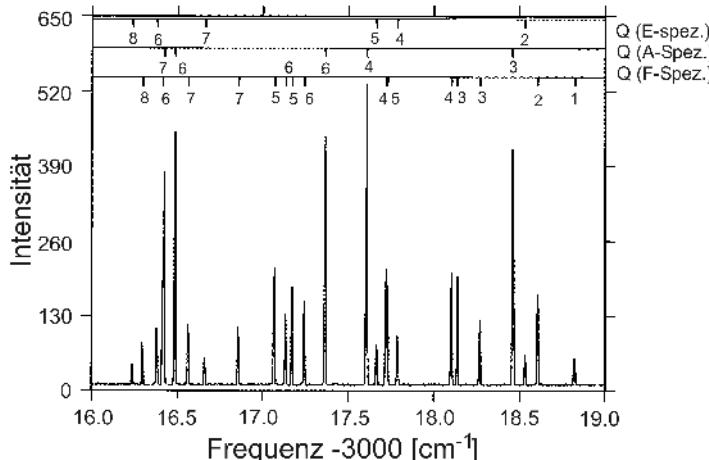


Abb. 7.9. DFWM-Spektrum von CH_4 bei einem Druck von 20 mTorr im Bereich der CH-Streckschwingungsbande

Anwendung von FWM-Spektroskopiemethoden. Die DFWM-Methode eignet sich bevorzugt zur Untersuchung von nicht-, oder aufgrund von Umgebungseinflüssen reduziert fluoreszierenden Spezies in Flüssigkeiten und Gasen. In Gasen trifft das z.B für Kohlenwasserstoffe (Methan) zu. Abbildung 7.9 zeigt das DFWM-Spektrum von CH_4 im Frequenzbereich der C-H-Streckschwingung bei 3000 cm^{-1} und einer hohen spektralen Auflösung des verwendeten Lasersystems. Häufig verwendet man auch Vierwellenmischungsmethoden bei der Untersuchung des Ladungstransportes in Halbleitern.

7.2.2 Lasermassenspektroskopie

Neben zahlreichen Anwendungen in der Grundlagenforschung bieten sich in der chemischen Analytik vielversprechende Aussichten für einen routinemäßigen Einsatz der Lasermassenspektroskopie. Bei diesem Verfahren werden mehrere Photonen bei hohen Laserintensitäten resonant oder nichtresonant absorbiert, bis eine Ionisation des Absorbers eintritt. Resonanzverstärkte Mehrphotonenionisation (resonant-enhanced multi-photon ionisation, REMPI) erfolgt durch resonante Anregung mit n Photonen in einen vibronischen Zwischenzustand, gefolgt von einer Anregung mit m Photonen in das Ionisationskontinuum [1].

Abbildung 7.10 zeigt Beispiele solcher Absorptionsprozesse. Bei der $1+1$ -MPI wird ein Zustand des Teilchens durch Absorption eines Photons resonant angeregt, Absorption eines weiteren Photons führt zur Ionisation. Bei $2+2$ -MPI wird durch gleichzeitige nichtresonante Absorption zweier Photonen ein Zwischenzustand (wie er durch 1-Photonenabsorption aus Paritätsgründen nicht erreicht werden kann) besetzt, bevor zwei weitere nichtresonant absorbierte Photonen zur Ionisation führen. Abbildung 7.10 zeigt weiterhin die $1+1$ -Anregung eines „selbstionisierenden“ Zustands. Selbst- (oder Prä-)ionisation erfolgt aus gebundenen atomaren oder molekularen Zuständen, deren

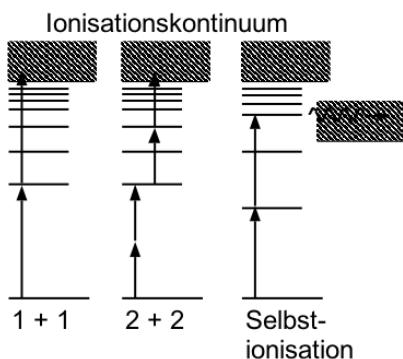


Abb. 7.10. Energieniveaudiagramme für verschiedene Möglichkeiten der resonant verstärkten Multiphotonenionisation (REMPI)

Energie höher ist als das niedrigste Ionisationspotential. Solche Zustände kann man durch Anregung eines Elektrons aus einer inneren Schale oder durch Anregung von zwei Elektronen der Valenzschale besetzen. Die Anregung einer inneren Schale führt dazu, dass ein Elektron einer benachbarten Schale die Leerstelle besetzt und ein äußeres Elektron ionisiert wird (Auger-Effekt). Solche selbstionisierenden Zustände sind gebunden und relativ langlebig (scharfe Resonanzen, große Querschnitte), was für einen empfindlichen Nachweis günstig ist.

Beispiel: NO: hohe Ionisationsenergie: entweder $2 \times 226 \text{ nm}$ (hier: Nachweisempfindlichkeit ca. $10^5 \text{ Teilchen/cm}^3$) oder $4 \times 452 \text{ nm}$ oder $1 \times 123 \text{ nm}$ ($\approx 11 \text{ eV}$), um in den $\text{NO}^+-(\text{X}^1\Sigma^+)$ -Zustand zu gelangen. Die Anregungswahrscheinlichkeit für einen $(n+m)$ -Prozess ist dabei ungefähr proportional zu I^{n+m} , sodass hohe Photonendichten nötig werden. Dies erreicht man am einfachsten durch Fokussieren der Laserstrahlen.

Literatur

1. Demtröder W (1993) Laserspektroskopie. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
2. Eckbreth AC (1996) Laser diagnostics for combustion temperature and species. Gordon & Breach, New York London
3. Goss LP (1993) CARS instrumentation for combustion applications. In: Taylor AMKP (ed) Instrumentation for flows with combustion. Academic Press, New York, pp. 251–320
4. Schrader B (ed) (1995) Infrared and Raman spectroscopy. VCH, Weinheim
5. Valentini JJ (1985) Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. In: Vanasse GA (ed) Spectrometric techniques. Academic Press, New York, pp. 1–62

8 Konfokale Mikroskopie in der Genomforschung

C. Cremer

In dem hier vorgelegten Übersichtsbeitrag wird die Anwendung der konfokalen Laserscanningfluoreszenzmikroskopie (LSFM) in der Genomforschung an einigen konkreten Beispielen verdeutlicht, wobei Fragen der digitalen Mikroskopie und Bildverarbeitung im Vordergrund stehen. Insbesondere werden neue methodische Ansätze skizziert, mit Hilfe einer Kombination multispektraler molekularbiologischer Markierungstechniken mit Verfahren der konfokalen Mikroskopie und ihrer Weiterentwicklung, eine „spektrale Hochpräzisionsmikroskopie“ jenseits der klassischen Auflösungsgrenzen der Fernfeldlichtmikroskopie „dicker“, transparenter biologischer Objekte zu realisieren. Langfristig zeichnen sich damit Möglichkeiten ab, lichtmikroskopische Untersuchungen zur räumlichen Topologie des Genoms in dreidimensional konservierten („intakten“) Zellkernen mit *molekularem Auflösungs„äquivalent“* durchzuführen und damit zu einem vertieften Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung des menschlichen Genoms beizutragen.

8.1 Problemstellung

Die Erfindung des zusammengesetzten Mikroskops durch holländische, italienische und englische Optiker und Forscher vor rund drei Jahrhunderten bezeichnet den Beginn einer Entwicklung, die im Verlauf des 19. Jahrhunderts fundamentale Entdeckungen ermöglichte. Diese wurden zur Grundlage der modernen Biologie: Zelle, Zytoskelett, Zellkern und Chromosomen sind auch im Zeitalter der molekularen Medizin zentrale Begriffe der Wissenschaft vom Leben geblieben.

Zellkerne im Körper von Säugern, beim Menschen beispielsweise, haben einen typischen Durchmesser von etwa 5–10 µm, während die in ihnen enthaltenen DNA-Stränge der 46 Chromosomen insgesamt etwa 7 Mrd. Basenpaare enthalten und rund 2 m lang sind. Diese zwei Meter DNA-Doppelhelix müssen in einem Volumen untergebracht werden, das einen rund zweihunderttausendmal kleineren Durchmesser hat, und zwar in einer Weise, die eine geordnete, vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängige Transkription der in der DNA enthaltenen Information in RNA erlaubt. Darüber hinaus muss die Unterbringung dieser großen Menge von DNA im Zellkern so erfolgen, dass eine zuverlässige Verdopplung (Replikation) der chromosomal DNA sowie eine effiziente Reparatur von DNA-Schäden möglich ist. Dies bedeutet, dass die entsprechenden Abschnitte der DNA in geeigneter Weise für die bei diesen Prozessen benötigten großen Proteinkomplexe zugänglich sein

müssen. Weiterhin müssen die primären, bis zu hunderten von Kilobasen umfassenden RNA-Transkriptionsprodukte weiteren spezifischen Modifikationen (dem Splicing) unterworfen und anschließend (vermutlich an spezifischen Stellen, den Kernporen) aus dem Zellkern hinausgeschleust werden. Schließlich müssen diese Probleme so gelöst werden, dass ein rascher Übergang der Zelle von der stoffwechselaktiven Interphase zur Mitose und umgekehrt stattfinden kann. Diese grundlegenden Bedingungen lassen eine geordnete dreidimensionale (3D) Genomorganisation vermuten, eine „Architektur“ des Zellkerns, die sich im Laufe der Evolution als optimale Lösung des Struktur-Funktions-Problems entwickelt hat.

Aus einer funktionellen Bedeutung der 3D-Genomorganisation ergibt sich als Konsequenz ihre Relevanz auch für pathologische Prozesse. Im Folgenden seien einige Beispiele genannt:

1. Die Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung oder andere Agentien, resultierend z.B. in DNA Doppelstrangbrüchen (DSB), führt je nach der Lokalisation im Genom in unterschiedlicher Häufigkeit zu sichtbaren Veränderungen (Aberrationen) an den Chromosomen (*hot und cold spots*). Es wird vermutet, dass dabei die jeweilige Sequenz der DNA sowie die Struktur und der Regulationszustand des Chromatins (Gesamtheit der chromosomal DNA-/Proteinkomplexe) des Zellkerns von Bedeutung sind. Ebenso sind die zahlreichen Prozesse, durch die die Schäden repariert werden, abhängig von DNA Sequenz und Chromatinstruktur. So ist es z.B. wahrscheinlich, dass ionisierende Strahlung nur dann zu der mit einer chronisch myeloischen Leukämie (Ph^+) funktionell korrelierten Chromosomentranslokation führt, wenn die 3D-Struktur der beteiligten Regionen auf Chromosom 9 und 22 die für die Bildung einer Translokation erforderliche gleichzeitige Bindung der Bruchpunktstellen an demselben Reparaturkomplex zulässt.
2. Völlig unbekannt sind die Mechanismen, die der Entstehung größerer Rearrangierungen im Genom zu Grunde liegen. Dies betrifft auch die Gesetzmäßigkeiten, nach denen die Integration von Fremd-DNA ins Genom erfolgt, z.B. von viraler DNA, oder von DNA-Sequenzen bei *Genetargeting*-Ansätzen. Inwieweit hier eine aufgrund molekularbiologischer Daten vermutete „regellose“ Integration in das Wirtsgenom von den Randbedingungen der dreidimensionalen Chromatinstruktur abhängt, wurde bislang nicht untersucht. Derartige 3D-Randbedingungen könnten jedoch eine essentielle Bedeutung haben für die Regulation von Transkription, Replikation und Reparatur der integrierten Abschritte und damit eine erhebliche biomedizinische Relevanz besitzen.

Die dreidimensionale Mikroskopie, insbesondere die konfokale Laserscanning-fluoreszenzmikroskopie (CLSM), hat in Verbindung mit molekularbiologischen und immunhistochemischen Markierungsverfahren völlig neue Möglichkeiten für die Untersuchung der präzisen räumlichen Organisation des Genoms eröffnet.

8.2 Methodische Grundlagen der dreidimensionalen Mikroskopie

8.2.1 Grundprinzip

Bei Mikroskopobjektiven hoher numerischer Apertur ist die Schärfentiefe oft wesentlich geringer als die Ausdehnung des biologischen Objekts in Richtung der optischen Achse. Diese geringe Schärfentiefe kann auch dazu verwendet werden, ein dreidimensionales Bild des gesamten Gegenstands zu erhalten: Man bringt hintereinander befindliche Teile des Gegenstands nacheinander in den Schärfenbereich des zur Aufnahme eingesetzten Objektivs und nimmt jedesmal ein Bild auf; in jedem Bild ist nur derjenige Teil des Gegenstands scharf abgebildet, der sich in der Gegenstandsebene (+/- der jeweiligen Schärfentiefe) befindet (optisches Schneiden). Durch Zusammensetzen einer Serie von optischen Schnitten (z.B. mit Hilfe von dreidimensionaler Segmentierung und Computergraphik) kann man schließlich ein dreidimensionales Bild des Gegenstands gewinnen. Je mehr optische Schnitte zur Rekonstruktion benutzt werden, d.h. je kleiner die Differenz Δz zwischen zwei benachbarten Schnittebenen ist, desto zuverlässiger ist die Rekonstruktion. Je höher die numerische Apertur des verwendeten Mikroskopobjektivs ist, desto geringer ist die Schärfentiefe, desto höher ist die laterale Auflösung, desto höher demnach insgesamt die räumliche 3D-Auflösung.

Das optische Schneiden bildet auch die Grundlage der dreidimensionalen Mikroskopie des Zellkerns. Die verschiedenen Ebenen des Gegenstands, z.B. ein Zellkern mit spezifisch fluoreszenzgefärbten Chromosomenterritorien, werden nacheinander in den Schärfenbereich eines Mikroskopobjektivs hoher numerischer Apertur gebracht, und es werden optische Schnitte aufgenommen. Die 3D-Auflösung wird dabei durch die lateralen und axialen Halbwertsbreiten (FWHM, *Full Width Half Maximum*) der dreidimensionalen Intensitätspunktbildfunktion (PSF, *Point Spread Function*) des verwendeten optischen Systems beschrieben. Experimentell kann man die PSF eines Mikroskopobjektivs bei einer bestimmten Wellenlänge λ erhalten, indem man ein fluoreszierendes „Target“ mit einem Durchmesser $\ll \lambda$ zur Fluoreszenz anregt. Optisch wird das Target gekennzeichnet durch seine „spektrale Signatur“, also sein Anregungsspektrum, sein Fluoreszenzemissionsspektrum, sowie sein Fluoreszenzlebensdauerspektrum. Um die PSF bei einer bestimmten Wellenlänge λ (der Einfachheit halber wird hier $\lambda_{\text{exc}}(\text{excitation}) \approx \lambda_{\text{det}}(\text{detection})$ angenommen) zu erhalten, wird die dreidimensionale Verteilung der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen axialen Targetpositionen vermessen. Daraus werden dann die lateralen Halbwertsbreiten $\text{FWHM}_{x,y}$ sowie die axiale Halbwertsbreite FWHM_z der PSF ermittelt. Die $\text{FWHM}_{x,y}$ geben die laterale, die FWHM_z gibt die axiale Auflösung an. Um eine der numerischen Apertur des verwendeten Mikroskopsystems entsprechende axiale Auflösung auch tatsächlich zu erzielen, muss der axiale Abstand zwischen zwei aufeinan-

derfolgenden optischen Schnitten kleiner als die Hälfte der axialen Halbwertsbreite der Punktbildfunktion sein.

Als ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit eines 3D-Mikroskops wird auch das *Beobachtungsvolumen* V_{obs} angegeben; es wird definiert als das Volumen eines Ellipsoids mit den Achsen $\text{FWHM}_{x,y}/2$ und $\text{FWHM}_z/2$. Bei herkömmlichen Fluoreszenzhochleistungsmikroskopen ist die $\text{FWHM}_{x,y}$ und damit die laterale Entfernungsauflösung in der Objektebene zwischen zwei mit gleicher spektraler Signatur markierten Targets etwa 200 nm. Die experimentell bestimmte axiale FWHM (und damit die axiale Auflösung) beträgt unter biologisch relevanten Bedingungen hingegen etwa ein bis mehrere μm . Ob zwei punktförmige Targets als getrennt registriert werden können, hängt wegen der in lateraler und axialer Richtung unterschiedlichen FWHM von dem Abstand der Targets voneinander sowie von dem Winkel ab, den sie mit der optischen Achse des Mikroskopsystems bilden. Zwei in derselben Ebene befindliche Targets beispielsweise können in dem gewählten Beispiel noch bei einem Abstand von 200 nm unterschieden werden; zwei genau übereinander liegende Targets können nur dann von einander getrennt werden, wenn ihr axialer Abstand größer ist als ein bis mehrere μm . Die gesamte *mittlere 3D-Auflösung* eines aus Punkten gleicher spektraler Signatur bestehenden Objekts beträgt daher ebenfalls etwa 1 μm . Da ein Zellkern, ein menschlicher Lymphozyt beispielsweise, jedoch nur einen Gesamtdurchmesser von typischerweise 10 μm hat, ist eine Analyse der 3D-Feinstruktur des Genoms mit dem beschriebenen Verfahren der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie hoher numerischer Apertur unter Verwendung von markierten Targets gleicher spektraler Signatur *nicht* möglich. Die gleiche Konsequenz ergibt sich auch, wenn man das Beobachtungsvolumen betrachtet: Mit lateralen FWHM von 200 nm sowie einer axialen FWHM von 1 μm ergibt sich $V_{\text{obs}} = 0,021 \mu\text{m}^3$. Bei einem Gesamtvolumen eines sphärisch angenommenen Zellkerns von 10 μm Durchmesser von 524 μm^3 erscheint das genannte Beobachtungsvolumen zunächst relativ klein zu sein. Vergleicht man es jedoch mit dem DNA-Gehalt eines derartigen Kerns von ca. 7×10^9 Basenpaaren (bp), so liegen im Mittel in einem derartigen Beobachtungsvolumen noch rund 280 Kilobasenpaare (kbp) an DNA: Eine innere räumliche Struktur solcher bereits relativ großer Gebilde kann demnach auf die beschriebene Weise (d.h. bei Markierung von Zielsequenzen innerhalb des Beobachtungsvolumens mit Fluorochromen gleicher spektraler Signatur) nicht mehr mit Methoden der Fernfeld-Lichtmikroskopie (Arbeitsabstand Objektiv-Target viele Wellenlängen) analysiert werden.

8.2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur historischen Entwicklung. Die konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie (CLSM) entwickelte sich seit den 60er Jahren aus zwei Wurzeln: der konfokalen Mikroskopie von transmittiertem und reflektiertem Licht auf

der Grundlage konventioneller Lichtquellen, und aus der Weiterentwicklung von Lasermikrobestrahlungstechniken von Zellen.

Konfokale Mikroskopie mit konventionellen Lichtquellen. Um die „Schärfentiefe“ der optischen Schnitte zu vermindern und damit die räumliche Entfernungsauflösung bei zellulären Objekten wesentlich verbessern zu können, mussten grundsätzlich neue Wege der hochauflösenden, dreidimensionalen Lichtmikroskopie gefunden werden. Eine derartige Möglichkeit wurde vor rund 40 Jahren vorgeschlagen ([66]; zur historischen Entwicklung s. [64]): die konfokale Scanningmikroskopie. Minskis Vorstellungen zufolge wird das zu untersuchende Objekt „punktweise“ mit einer konventionellen (inkohärenten) Lichtquelle beleuchtet. Das vom Objekt reflektierte oder transmittierte Licht wird jeweils registriert, und die so erhaltenen Signale werden dann zu einem Bild des Objekts zusammengesetzt. Die entscheidende neue Idee des Scanningverfahrens war die „konfokale“ Detektion, d.h. die Anbringung einer kleinen Blende in der Bildebene des Mikroskopobjektivs. Diese Blende wurde so klein gewählt, dass sie nur das Licht aus der jeweils eingestellten Objektebene zum Detektor durchließ; die Schärfentiefe sollte auf diese Weise drastisch vermindert und die 3D-Auflösung daher erheblich verbessert werden können.

Konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie (CLSM). Eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung der hochauflösenden Laser-scanningfluoreszenzmikroskopie war die beugungsbegrenzte Fokussierung von kohärentem Licht durch Optiken hoher numerischer Apertur; die Frequenz des kohärenten Lichts musste genügend hoch sein, um eine spezifische Anregung von biologisch relevanten Fluoreszenzfarbstoffen zu gestatten; die Anregungsintensität musste eine ausreichende Konstanz besitzen. Daraus folgte als praktische Konsequenz der Einsatz von Gaslasern mit einer Wellenlänge $\leq 500\text{ nm}$ bzw. die Frequenzverdoppelung von kohärentem Licht größerer Wellenlänge.

Bereits wenige Jahre nach der Entdeckung des Lasers wurden Laserstrahlen mit Hilfe von Mikroskopobjektiven beugungsbegrenzt fokussiert und zur gezielten Mikrobestrahlung von kleinen Arealen von Zellen eingesetzt. Im Vordergrund stand damals vor allem die Ausschaltung ausgewählter zellulärer Bereiche durch gepulstes Laserlicht im sichtbaren und nahen ultravioletten Wellenlängenbereich. Andere Arbeitsgruppen befassten sich mit Auswirkungen durch Mikrobestrahlung relativ geringer Intensität mit Hilfe von kontinuierlichen Gaslasern. Frequenzverdoppeltes, beugungsbegrenzt durch ein Mikroskopobjektiv hoher numerischer Apertur fokussiertes Licht der 514,5-nm-Emission eines Argon-Ionen-Lasers ergab z.B. erste direkte Belege, dass auch in Säugerzellen *in vivo* die Chromosomen normalerweise in Territorien angeordnet sind [24, 108]. Andere Anwendungen der Laser-UV-Mikrobestrahlungstechnik betrafen Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie der *Drosophila* [59, 60, 70].

Beim Bau derartiger Lasermikrobestrahlungsapparaturen wurde beobachtet, dass fokussiertes kohärentes Licht der Wellenlänge $l_{\text{exc}} = 257,25 \text{ nm}$ zur Fluoreszenzanregung in einem sehr kleinen Bereich in der Objektebene eingesetzt werden konnte. Der Radius des so erzielten, grün fluoreszierenden „Fluoreszenzspots“ wurde experimentell zu ca. 200 nm abgeschätzt [21]. Auf der Grundlage dieser experimentellen Beobachtungen wurde ein weiterentwickeltes 3D-Fluoreszenzkopieverfahren für biologische Mikroobjekte konzipiert und Einzelheiten seiner technischen Realisierbarkeit diskutiert, das die Möglichkeiten spezifischer Antikörperfluoreszenzmarkierungen berücksichtigte; in seinen wesentlichen Grundlagen war es äquivalent der später als *konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie* (CLSM) bezeichneten Methode ([20, 22]; zur historischen Entwicklung s. [73]): Das spezifische, z.B. mit fluoreszierenden Antikörpern markierte biologische Mikroobjekt wird Punkt für Punkt von einem beugungsbegrenzt fokussierten kurzweligen Laserstrahl abgetastet und zu der Aussendung von Fluoreszenzlicht angeregt; auf das in anderen konfokalen Anordnungen (z.B. [66]) beschriebene Anregungs-Pinhole wird hier aufgrund geeigneter Kohärenzbedingungen der Laserlichtquelle (TEM₀₀-Mode) verzichtet. Das Fluoreszenzlicht wird punktweise von einem Photomultiplier (PMT) registriert und daraus das Bild elektronisch wie bei einem Fernsehbild zusammengesetzt. Ähnlich wie bei Minski und anderen war in der Bildebene vor dem Photomultiplier eine Blende (Pinhole) vorgesehen, um weitgehend nur dasjenige Fluoreszenzlicht durchzulassen, das von dem jeweils beleuchteten Gegenstandspunkt stammte; der Durchmesser der Blende sollte dem Durchmesser des Beugungsscheibchens entsprechen, das von einer in der Objektebene befindlichen punktförmigen Lichtquelle erzeugt wird.

Arbeitsgruppen am Europäischen Labor für Molekularbiologie in Heidelberg (EMBL) sowie an den Universitäten Amsterdam und Stockholm haben erstmals für biologische Anwendungen brauchbare konfokale Laserscanning-fluoreszenzmikroskope realisiert ([14, 16, 91, 101]; Übersicht bei [64, 73]). Die zu erwartenden dreidimensionalen konfokalen PSF und ihre lateralen und axialen FWHM lassen sich theoretisch durch Multiplikation der Beleuchtungs-PSF mit der Detektions-PSF gewinnen, die sich ihrerseits aus der Berechnung der (elektromagnetischen) Feldverteilung ergeben. Für Einzelheiten der Berechnung sei auf [45] sowie den Beitrag von S. Hell in dieser Publikationsserie verwiesen).

Zum Stand der Technik der CLSM. Im Rahmen einer nunmehr rund zwei Jahrzehnte andauernden Entwicklung hat die technische Ausstattung der CLSM sich immer weiter verfeinert. Derzeitige typische Laserausstattungen sind Argon-Ionen-, Krypton-, sowie HeNe-Laser; üblicherweise wird eine Bildebene (Größe z.B. 512×512 Pixel) mit Hilfe des durch Spiegel im Strahlengang bewegten fokussierten Laserstrahls abgescannt; die axiale (z)-Position wird durch Verstellung des Objekttrichters realisiert, die Schrittweite

beträgt normalerweise hundert bis einige hundert Nanometer. Die angeregten Fluoreszenzfarbstoffe gehören z.Z. in den meisten Fällen der Klasse der Isothiocyanate (z.B. FITC) oder Rhodaminfarbstoffe (z.B. TRITC) an. Die durch geeignete Sperrfilter voneinander getrennten Fluoreszenzsignale werden nach Durchlaufen der für die konfokale Detektion erforderlichen Blende(n) mit verschiedenen Photomultipliern (PMT) getrennt voneinander registriert; derzeit kommerziell erhältliche Systeme haben drei PMT, mitunter auch mehr; unter günstigen Bedingungen beträgt der „cross talk“ wenige Prozent und darunter. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird meist dieselbe Bildecke mehrfach (bis zu 32-mal) gescannt. Bei Verwendung von Objektiven hoher numerischer Apertur werden (nominelle) Auflösungen (FWHM) von 180 nm lateral und 350 nm axial angegeben. Weitere technische Einzelheiten sind ausführlich z.B. bei [64, 73] referiert.

Die mit diesen Instrumenten unter *biologisch* relevanten Bedingungen experimentell erzielten lateralen bzw. axialen FWHM der konfokalen 3D-PSF sind typischerweise ca. 200–250 nm für die lateralen Halbwertsbreiten und ca. 500–600 nm für die axiale Halbwertsbreite. Außerdem ist der optische Kontrast erheblich besser als bei der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie.

Gibt man als Maß für die 3D-Auflösung das Beobachtungsvolumen an, so ist dieses bei der CLSFM um ein Mehrfaches reduziert gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie bei gleicher numerischer Apertur und Wellenlänge.

Axialtomographische CLSFM. In den bisher genannten CLSFM-Methoden ist die räumliche Position des Objekts in Bezug auf das Mikroskop (mit Ausnahme der axialen Verschiebung) fixiert. Liegen beispielsweise zwei chromosomal markierte Targets derselben spektralen Signatur mit einem Abstand von 400 nm in axialer Richtung übereinander (d.h. gleiche x, y -Position), so können sie mit den genannten Methoden nicht mehr aufgelöst werden, da dieser Abstand kleiner ist als die axiale FWHM der konfokalen PSF. Die Grundidee der axialtomographischen Mikroskopie [7–9] besteht darin, das Objekt in einer Glaskapillare bzw. auf einer Glasfaser zu fixieren und dann unter dem Mikroskopobjektiv um verschiedene Winkel zu drehen. Zusätzlich kann natürlich auch eine axiale Verschiebung erfolgen. Aus den aufgenommenen Bildern kann dann grundsätzlich ein 3D-Bild mit erhöhter effektiver 3D-Auflösung zusammengesetzt werden. Dreht man beispielsweise in dem o.g. Beispiel den Zellkern um 90°, so liegen die beiden Targets in der Objektebene; dort ist die laterale FWHM erheblich besser, die beiden Targets können also nun trotz der gleichen spektralen Signatur voneinander unterschieden werden.

Auch 3D-Distanzen zwischen Targets im Zellkern können mit Hilfe der Axialtomographie erheblich genauer gemessen werden: Man ermittelt die lateralen Distanzen D_{xy} in Abhängigkeit vom Drehwinkel. Aus einfachen geometrischen Überlegungen folgt, dass die dabei beobachtete *maximale* late-

rale Distanz $D_{xy,\max}$ zugleich die euklidische 3D-Distanz zwischen den beiden Targets ist. Messungen an Fluoreszenzbeads der gleichen spektralen Signatur sowie an fluoreszenzmarkierten Chromatinregionen in Zellkernen auf Glasfasern zeigten, dass mit der axialtomographischen CLSM grundsätzlich 3D-Distanzmessungen zwischen den Schwerpunkten der Fluoreszenzintensität mit einem Fehler bis unter 10 nm möglich sind [10,11].

Statt das Objekt selbst zu drehen, ist es auch möglich, das Fluoreszenzlicht gleichzeitig von verschiedenen Seiten aus (konfokal) zu registrieren. Auch bei dieser *Thetamikroskopie* genannten Methode ergibt sich eine wesentliche Auflösungsverbesserung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie mit gleicher numerischer Apertur [58,92]. Der große Vorteil der Thetamikroskopie liegt vor allem bei der hochauflösenden, dreidimensionalen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von vielzelligen, in axialer Richtung bis zu 1 mm ausgedehnten Objekten.

8.2.3 Fluoreszenzmarkierungstechniken für die 3D-Mikroskopie des Genoms

Ein für die Genomforschung wirkungsvoller Einsatz der 3D-Mikroskopie im Allgemeinen und der konfokalen Laserscanningfluoreszenzmikroskopie im Besonderen ist nur möglich, wenn in der Zelle biochemisch, molekularbiologisch, oder funktionell charakterisierte Subregionen spezifisch mit einer Fluoreszenzmarkierung geeigneter spektraler Signatur versehen werden können. Dies muss *in situ* erfolgen, d.h. an Ort und Stelle, in dem dreidimensional soweit als möglich konservierten („intakten“) biologischen Objekt. Hierzu wurden eine Reihe von *In-situ*-Markierungsverfahren entwickelt, die auf molekularbiologischen bzw. immunhistochemischen Grundlagen beruhen.

In-situ-Hybridisierung. Molekularbiologische Verfahren haben es erstmals möglich gemacht, individuelle chromosomale DNA-Sequenzen im Zellkern direkt sichtbar zu machen. Diese Visualisierung beruhte auf der Anwendung der 1969 von Gall eingeführten Methode der *In-situ*-Hybridisierung. Bei diesem Verfahren werden in der Regel einzelsträngige, markierte DNA- (oder RNA-) Sequenzen (Proben) an komplementäre, einzelsträngige (denaturierte) chromosomale DNA-Zielabschnitte (*Targets*) *in situ* hybridisiert, d.h. am Ort des Targets in den Zellen selbst. Die Markierung der Proben erfolgte zunächst mit Hilfe von Radioisotopen (insbesondere von tritiummarkiertem Thymidin) und anschließender autoradiographischer Entwicklung, später dann durch nichtradioaktive Verfahren, insbesondere der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Bei diesen Verfahren werden die Proben chemisch modifiziert, z.B. durch Ankoppeln eines Biotin- oder eines Digoxigeninmoleküls über einen „Linker“ geeigneter Länge. Der Nachweis der Markierungsorte *in situ* erfolgt dann durch spezifische Anbindung von Farbstoffen, z.B. von fluoreszierenden Antikörpern. In den letzten Jahren ist auch eine direkte Markierung der Proben mit Fluorochromen möglich geworden. Heute steht eine

Vielzahl verschiedener DNA-Proben und komplexer Probengemische zur Verfügung; derzeit erlauben sie es, in menschlichen Zellen alle Chromosomen, alle Chromosomenarme, sowie eine Vielzahl noch kleinerer chromosomaler Subregionen und individueller Gene spezifisch fluoreszenzzumarkieren [25–28, 36, 56, 57, 65, 74]. Vergleichbare Markierungsmöglichkeiten bei verschiedenen anderen Spezies sind in Entwicklung.

Unterschiedliche chromosomale Targets können gleichzeitig mit Hilfe von Proben verschiedener spektraler Signatur unabhängig voneinander registriert werden. Derzeit gibt es bereits eine Reihe solcher gleichzeitig für DNA-Markierungen verwendbarer Fluorochrome, bei denen die individuelle spektrale Signatur durch Unterschiede im Absorptionsspektrum oder Fluoreszenzemissionsspektrum gegeben ist. Mit Hilfe von Korrelationsalgorithmen ist eine eindeutige Zuordnung von Targets auch dann möglich, wenn Kombinationen von Fluorochromen mit einer Überlappung von Absorptions-/Emissionspektrien bei der Markierung verwendet werden. Beispielsweise erlauben 5 Fluorochrome unterschiedbarer spektraler Signatur $2^5 - 1$ verschiedene Kombinationen. Demnach können auf diese Weise bis zu 31 Targets voneinander allein aufgrund ihrer Fluoreszenzemissionsspektrums unterschieden werden. Die Anwendung dieser Methode erlaubte die gleichzeitige, pixelweise Identifikation aller menschlichen Chromosomen in Metaphasezellen [87, 90].

Immunhistochemische Verfahren. Von fundamentaler Bedeutung für die Organisation des Zellkerns ist die Interaktion zwischen chromosomaler DNA und Proteinkomplexen, die bei Transkription, Splicing, Replikation, Reparatur, Transport, sowie der Aufrechterhaltung bestimmter transkriptionsaktiver/inaktiver Chromatinzustände beteiligt sind. Immunhistochemische Proteinmarkierungsmethoden sind daher neben den In-situ-Markierungs-techniken für Nukleinsäureproben essentiell. Zahlreiche bisher durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Zellkernen nach immunhisto-chemischer Markierung von Proteinen ergaben komplexe Verteilungen dieser Komponenten im Zellkern [89, 107]. Besonders auffällig war hier die immer wiederkehrende Akkumulation solcher Faktoren in „Speckles“ oder „Foci“.

8.2.4 Dreidimensionale Digitale Bildverarbeitung

Um die in den 3D-Mikroskopiedaten enthaltene Information über die Architektur des Zellkerns voll auswerten zu können, ist eine quantitative, dreidimensionale, digitale Bildverarbeitung unverzichtbar. Sie ermöglicht beispielsweise, bei Chromosomenterritorien quantitative Angaben zu Volumen, Oberfläche, Rundheit und räumlicher Verteilung im Kern zu gewinnen, sowie quantitative Angaben zur räumlichen Verteilung von subchromosomalen markierten Abschnitten oder von Proteinen zu erhalten. Solche quantitativen Angaben sind von wesentlicher Bedeutung für einen Vergleich mit quantitativen Modellen der Architektur von Chromosomen und Zellkern.

An dieser Stelle seien einige 3D-Bildverarbeitungsverfahren genannt, die bei der Untersuchung der Zellkernarchitektur jetzt bereits eine Rolle spielen:

Der Cavalieri-Estimator. Bei diesem Verfahren werden die fluoreszenzgefärbten Orte eines Chromosomenterritoriums oder anderer markierter Bereiche in jedem optischen Schnitt aufgrund der Höhe des Signals Bildelement für Bildelement mittels eines Schwellwertes extrahiert (segmentiert). Die Bestimmung dreidimensionaler Bildparameter geschieht durch Addition der für die einzelnen optischen Schnitte ermittelten Werte. So erlaubt die Summation der segmentierten Flächen in den einzelnen Schnitten multipliziert mit dem axialen Abstand zwischen diesen eine Bestimmung des gesamten Volumens des Territoriums bzw. der Markierung, in dem Bildelemente oberhalb einer bestimmten Signalstärke vorhanden sind. Die Summe der Randlängen der segmentierten Bereiche in den einzelnen optischen Schnitten multipliziert mit dem axialen Abstand der Schnitte ergibt ein Maß für die 3D-Oberfläche des Territoriums bzw. der Markierung, soweit es Bildelemente oberhalb des gewählten Schwellwertes betrifft. Aus den aufgrund des Cavalieri-Estimators ermittelten Voxeln des fluoreszenzmarkierten Targets kann ein Intensitätsschwerpunkt berechnet werden [11, 81]. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei biologischen Objekten normalerweise der „richtige“ Schwellwert für die Segmentierung nicht *a priori* bekannt ist; in diesem Fall kann ein Schätzwert für die Positionierung des Targets als Mittelwert des aus einer Reihe von Schwellwerten berechneten Positionswertes ermittelt werden. Einen Schätzwert für den Fehler der Positionierung erhält man in diesem Fall aus der Standardabweichung der o.g. Positionsdaten vom Mittelwert.

Die Voronoi-Tessellierung. Bei dem Voronoi-Verfahren in seiner Anwendung auf die Analyse von Chromosomenterritorien wird der 3D-Datensatz in einem schrittweisen Verfahren nach geometrischen Kriterien in immer feiner unterteilte Vielecke (Polyeder) unterteilt. Die Unterteilungsprozedur wird abgebrochen, wenn bestimmte Kriterien erfüllt sind, z.B. eine bestimmte mittlere Größe der Polyeder, eine bestimmte Homogenität der Grauwertdichte etc. Das interessierende Objekt wird anschließend mit Hilfe eines Schwellwertes segmentiert. Zum Beispiel wird angenommen, dass alle diejenigen miteinander zusammenhängenden Polyeder zu demselben Chromosomenterritorium gehören, die eine mittlere Grauwertdichte oberhalb eines festgelegten Wertes besitzen. Daran anschließend können z.B. das Gesamtvolume der so segmentierten Polyeder oder ihre Gesamtoberflächen gegenüber nichtsegmentierten Polyedern (die durch mittlere Grauwertdichten unterhalb des Schwellwertes ausgezeichnet sind) bestimmt werden. Insgesamt erhält man demnach ein Maß für die einhüllende Gestalt des Territoriums.

Volumenkonservierende 3D-Segmentierung kleiner Objekte. Die CLSFM erlaubt die 3D-Vermessung auch von kleinen fluoreszenzmarkierten

Objekten in Zellkernen, d.h. von Targets, deren Abmessungen nahe oder unterhalb der lateralen bzw. axialen FWHM der konfokalen PSF liegen. Zur besseren 3D-Bildanalyse derartiger Targets wurde ein Verfahren entwickelt [5], das eine Segmentierung unter Berücksichtigung der (experimentellen) konfokalen PSF für die verwendeten spektralen Signaturen erlaubt. Dazu wurde die konfokale Abbildung von Modellobjekten rechnerisch simuliert (*virtuelle Mikroskopie*). Die volumenkonservierende Schwellwertintensität am Rand eines Modellobjekts relativ zur Maximalintensität zeigte dabei eine starke Abhängigkeit vom Targetvolumen, die sich durch eine monoton fallende Intensitätsvolumenfunktion beschreiben ließ, die von der jeweils relevanten konfokalen PSF abhängig war. Zu jedem Originalvolumen des Targets konnte ein relativer Schwellwert (bezogen jeweils auf das Maximum der Intensitätsverteilung) berechnet werden, durch dessen Anwendung das Originalvolumen segmentiert werden konnte: Daraus ergab sich eine Kalibrierungsfunktion $Th_{rel}(V)$, die jedem Targetoriginalvolumen bei gegebener spektraler Natur und konfokaler Optik einen volumenkonservierenden relativen Schwellwert zuordnete. Bei einem Target von zunächst unbekanntem Volumen findet das Segmentierungsverfahren zunächst Orte lokaler Intensitätsmaxima mit Hilfe eines oktaederähnlichen Top-Hat-Filters. Ausgehend von diesen Orten werden die Targets durch einen iterativen 3D-Wachstumsprozess unter Verwendung der o.g. Funktion Th_{rel} segmentiert. Die Anwendung dieses Verfahrens auf simulierte Verteilungen von kleinen Modelltargs in Zellkernvolumina unter Verwendung experimenteller konfokaler PSF für ein Mikroskopobjektiv der Numerischen Apertur 1,32 und die Fluorochrome FITC (Fluoresceinisothiocyanat), TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) und CY5 (Farbstoff mit Emission im nahen Infrarot) ergab eine brauchbare Segmentation von Targetvolumen und Targetradius auch erheblich unterhalb des konfokalen Beobachtungsvolumens bzw. der konfokalen FWHM.

In weiteren Modellsimulationen unter Anwendung dieses Segmentierungsalgorithmus wurde der Fehler der konfokalen 3D-Distanzmessung zwischen zufallsverteilten Targets im Zellkernvolumen abgeschätzt, wenn zusätzlich das Rauschen berücksichtigt wurde, das aus konfokalen experimentellen Messungen an fluoreszenzmarkierten biologischen Targets gleicher spektraler Signaturen [106] bestimmt wurde. Bei Targetverteilungen derselben spektralen Natur *ohne* Beschränkung der minimalen Distanz zwischen diesen ergab sich unter diesen Annahmen eine Standardabweichung der 3D-Distanzfehler ≤ 60 nm. Wurde eine minimale Distanz größer als die effektive FWHM gewählt, so sank die Standardabweichung der simulierten 3D-Distanzfehler auf ca. 30 nm; mit Hilfe eines verbesserten Algorithmus gelang es, auch bei konfokalen Modellbildern mit zufallsverteilten Targets ohne Abstandsbeschränkung (Radien 230 nm; Signal-zu-Rausch-Verhältnis wie oben) einen 3D-Distanzfehler < 30 nm zu erreichen [6].

8.2.5 Experimentelle Kalibrierungsmessungen

Als Basis für die Anwendung der CLSM in der Genomforschung sowie für die verbesserte Interpretation konfokaler Ergebnisse wurden eine Reihe von Kalibrierungsmessungen durchgeführt. Soweit nicht anders spezifiziert, wurden alle hier genannten Messungen mit einem Zweikanal-Leica TCS 4D CLSM unter Benutzung eines Ölchromatobjektivs $63 \times /1,32$ vorgenommen.

Messung der 3D-PSF mit Hilfe von Fluoreszenzbeads. Üblicherweise wird die PSF eines CLSM unter bestimmten standardisierten Bedingungen gemessen. Die für die konfokale Bildgewinnung in der Genomforschung relevante PSF weicht von diesen Bedingungen ab: es ist z.B. anzunehmen, dass der Brechungsindex des Mediums zwischen der zur Standardbestimmung der PSF benutzten Punktlichtquelle (in vielen Fällen ein Fluoreszenzbead mit einem Durchmesser $< \lambda/2$) und dem Deckglas sich etwas von dem in zellulären Präparaten gegebenen unterscheidet; das zelluläre Präparat kann kleine Brechungsindexinhomogenitäten enthalten, es kann Streuung auftreten etc. Bei axialtomographischer CLSM sind zusätzlich Veränderungen der PSF durch Brechungsindexunterschiede zwischen Einbettungsmedium und Glasfaser/Glaskapillare zu berücksichtigen [8].

Um eine bessere Annäherung an die bei konfokalen Messungen in der Genomforschung tatsächlich vorliegenden Brechungsindexbedingungen zu erreichen, wurden beispielsweise Fluoreszenzbeads verwendet, die zunächst auf einem $170\text{-}\mu\text{m}$ -Deckglas durch einen Trocknungsvorgang fixiert und anschließend in einem Einbettungsmedium von 90% Vectashield ($n = 1,458$) und 10% Pufferlösung (PBS; Phosphate buffererden saline; $n = 1,33$) vermessen wurden. Diese Mischung wurde gewählt, um den in biologischen Applikationen gegebenen zellulären Brechungsindex besser anzunähern [106]. Als Immersionsöl wurde hier Zeiss 518 C ($n = 1,518$, $T = 23^\circ\text{C}$) benutzt. Durch Verwendung von Fluoreszenzbeads mit FITC-ähnlichem Spektrum, mit TRITC-ähnlichem Spektrum, sowie mit Cy5-ähnlichem Spektrum war es möglich, die konfokalen PSF für diese spektralen Signaturen zu messen [5].

In-situ-Bestimmung der FWHM. Eine direkte Abschätzung der lateralen und insbesondere der axialen Halbwertsbreiten der konfokalen 3D-PSF kann auch direkt mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Targets innerhalb biologischer Objekte vorgenommen werden. Diese experimentelle Abschätzung beruht auf der Annahme, dass ein solches Target in der Auswirkung auf den konfokalen Abbildungsvorgang einem lokalen „Fluoreszenzsee“ verglichen werden kann. In diesem Fall gibt der Intensitätsanstieg an den Rändern des fluoreszierenden Objekts (von 15% auf 85%) eine obere Abschätzung für die FWHM. Auf dieser Grundlage wurden konfokale Messungen [80] an FITC-markierten Zentromertargets in Kernen von menschlichen Lymphozyten durchgeführt (verwendetes Objektiv: $100 \times /0.7\text{--}1.4$ NA PL APO;

Immersionsöl $n = 1,518$). Die auf diese Weise erhaltenen Mittelwerte für die laterale und die axiale FITC-FWHM waren mit 430 nm (lateral) bzw. 840 nm (axial) zwar deutlich höher als die theoretischen (idealen) Werte [45]; die minimalen Messwerte lagen jedoch bei 222 nm (lateral) und 664 nm (axial). Möglicherweise spiegelt die Variation tatsächliche Unterschiede in den individuellen konfokalen PSF wieder. Eine solche Variation der für eine bestimmte Zelle des relevanten PSF könnte hervorgerufen werden z.B. durch unterschiedliche Brechungsindexvariationen und/oder durch unterschiedliche axiale Positionierungen der Fluoreszenztargets im biologischen Objekt [46] oder auch durch Veränderungen in den apparativen Parametern des CLSFM zwischen verschiedenen Aufnahmen.

Da zur Durchführung der hier skizzierten FWHM-Abschätzung „*in situ*“ nur noch der 3D-Daten-Satz eines Objekts mit geeigneter Markierung benötigt wird, lassen sich auf diese Weise auch ohne Kenntnis der technischen Mikroskopparameter Aussagen über die tatsächlich erzielte 3D-Auflösung gewinnen.

Positionierungsgenauigkeit. Der erste Schritt zu einer Hochpräzisionsmessung von 3D-Distanzen aus konfokalen Bilddaten ist die genaue Lokalisierung der Schwerpunkte der interessierenden Targets im Bildraum ([62]).

CLSFM-Messungen an FITC-markierten Fluoreszenz-Latex-Beads von 1 μm Durchmesser [11] unter Anwendung des in Kap. 8.2.4 und 8.2.5 beschriebenen Auswertungsverfahrens ergaben Positionierungsfehler von 7,4 nm lateral (x, y), 19,2 nm axial (z), und 11,4 nm in 3D (x, y, z). Der Gesamtfehler (x, y, z) war dabei etwas kleiner als der Fehler in axialer Richtung; dies zeigt, dass die Messfehler voneinander abhängig sind. Der Positionierungsfehler gibt eine obere Grenze für die Genauigkeit der unter den gegebenen Bedingungen erreichbaren Distanzmessung zwischen Targets an; den genannten Messergebnissen zufolge liegt dieser bei dem hier verwendeten CLSFM (1 Photonenabsorption) sowie der Markierung mit dem Fluorochrom FITC und einem realistischen Signal-Rausch-Verhältnis bei ca. 10–20 nm (x, y, z). Bei axialtomographischer CLSFM ergaben sich bei geeigneter Rotation der Targets in die Objektebene noch etwas kleinere 3D-Positionierungsfehler (8,9 nm).

Erste Messungen des Positionierungsfehlers [11] wurden auch direkt in menschlichen Zellkernen an FISH-markierten Zentromerregionen vorgenommen (FITC-Fluoreszenz). Es ergaben sich bei dem normalen CLSFM-Verfahren (Zellen auf Objektträgern fixiert) Positionierungsfehler von 34 nm lateral (x, y), 39 nm axial (z), und 36 nm in 3D (x, y, z). Bei axialtomographischer CLSFM ergaben sich bei optimaler Rotation der auf Glasfasern fixierten und *in situ* hybridisierten Zellen jedoch erheblich kleinere, mit den o.g. Fluoreszenzbeadmessungen vergleichbare 3D-Positionierungsfehler (12 nm).

Simulationsrechnungen unter Einbeziehung der bildanalytischen Positionsbestimmung (Bornfleth, unveröffentlichte Resultate) zeigten, dass bei einer besseren Fluoreszenzphotonenstatistik (um mehrere Größenordnungen) noch

erhebliche weitere Verringerungen der Positionierungsfehler möglich sind. Darauf wurden zum Vergleich Positionierungsmessungen mit Fluoreszenzbeads mit Hilfe anderer fluoreszenzmikroskopischer Techniken durchgeführt, bei denen die von der Theorie postulierten Photonenstatistiken realisiert werden konnten:

- Messungen an einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop, das mit einer hochempfindlichen CCD-Kamera (Photometrics) ausgestattet war, ergaben bei Verwendung großer Fluoreszenzbeads (500 nm) eine laterale (x, y) Positionierungsgenauigkeit von ca. 1 nm [43].
- Auf der Basis der Standing Wave Field Microscopy [1,55] wurde das laserinterferometrische Fluoreszenzanregungsprinzip zu einem quantitativen Messverfahren unter Verwendung eines Detektorarrays (CCD-Kamera) zur Registrierung der Fluoreszenzemission weiterentwickelt [12,13], wobei die Schrittweiten in z -Richtung jeweils 20 nm betrugen; dabei wurden mittlere laterale (x, y) Positionierungsgenauigkeiten von $\pm 2,5$ nm sowie mittlere axiale (z) Positionierungsgenauigkeiten von $\pm 1,0$ nm erzielt [86].

Bei Verwendung punktweise scannender konfokaler Verfahren auf der Basis von Einphotonenabsorptionsprozessen würden derartig hohe Positionierungsgenauigkeiten bei Markierung mit gegenwärtig üblichen Fluorochromen und bei kleinen Targets zu unpraktikabel langen Aufnahmezeiten (Photonenstatistik) führen. Eine weitere wesentliche Verbesserung der 3D-Positionierungsgenauigkeit im Vergleich zu den o.a. Resultaten konnte jedoch auch bei punktweise scannenden Verfahren durch Zwei-Photonen-4 π -Mikroskopie [42, 51] erzielt werden. Langfristig erscheint für eine molekulare Dimensionen erreichende fernfeldmikroskopische Genomstrukturanalyse eine Kombination von punktweise scannenden konfokalen Verfahren mit Detektor-Array-Anordnungen (z.B. laserstimulierte quantitative Standing-Wave-Field-Mikroskopie) unter Ausnutzung von Ein- und Mehrphotonenanregung wünschenswert zu sein.

3D-Distanzmessung. In Abwesenheit von Fehlern der Scanschrittweite, von monochromatischen Aberrationen (z.B. Bildfeldverzerrungen, fokaler Verschiebung) und chromatischen Aberrationen (z.B. lateralen und axialen chromatischen Verschiebungen) könnte die Distanz zwischen zwei Targetschwerpunkten auf einfache Weise aus den gegebenen Positionierungen berechnet werden. Der Fehler der Distanzmessung würde in diesem „idealen“ Fall dem Positionierungsfehler entsprechen. Da jedoch dieser Fehler relativ klein ist ($< \lambda/10$), ist eine vergleichbar genaue Kenntnis der übrigen relevanten Fehler notwendig, wenn die hohe Positionierungsgenauigkeit für vergleichbar präzise Distanzmessungen von Nutzen sein soll.

CLSM-Distanzkalibrierungsmessungen. Eine Kalibrierung der lateralen Schrittweite des CLSM kann mit gängigen Resolution-Test-Targets vorgenommen werden. Experimentelle Messungen am hier verwendeten Leica-TCS

beispielsweise ergaben Schrittweiten von $77,5 \pm 1,6$ nm in x -Richtung und $82,0 \pm 1,9$ nm in y -Richtung [5].

Eine physikalische Kalibrierung des Distanzmessfehlers in axialer (z)-Richtung [5] wurde möglich durch die Verwendung von sphärischen Quarzglasobjekten, die einen mit Fluorochromen markierten Kern von 400 nm Durchmesser enthielten. Da der mittlere Gesamtdurchmesser der Quarzglasobjekte 1052 nm betrug und damit größer war als die laterale und die axiale FWHM, konnten die einzelnen Fluoreszenzkerne in zusammenhängenden Ansammlungen (Clusters) von Quarzglasobjekten mikroskopisch problemlos diskriminiert werden. Aufgrund der vom Hersteller angegebenen Variation des Durchmessers von 1,8% (± 19 nm) wurde aufgrund dieser Variation ein größerer Distanzmessfehler als der oben angegebene Positionierungsfehler erwartet. Die bei Clustern von eng benachbarten, sich berührenden Quarzglasobjekten in einer lateralen Ebene erhaltenen Standardabweichungen vom Distanzmittelwert stimmten mit optimalen Werten von ca. ± 15 nm (bei guter Signal-Rausch-Statistik) gut mit dieser Erwartung überein. Damit wurde bei dreidimensionalen Clustern von eng benachbarten, sich berührenden Quarzglasobjekten aufgrund des bekannten Centroidabstands eine außerordentlich genaue Kalibrierung der axialen Schrittweite unter Berücksichtigung auch der fokalen Verschiebung [46] möglich. Die aus den Messungen ermittelten mittleren Korrekturfaktoren für die z -Skalierung lagen bei den gegebenen Bedingungen bei 1,1.

Der (nach z -Skalierung) verbleibende Fehler σ_D der Distanzmessung zwischen jeweils zwei Targets (Standardabweichung vom Mittelwert) zeigte eine erhebliche Abhängigkeit von der Signal-Rausch-Statistik. Bei nur zweimaligem Scannen eines optischen Schnittes entsprechend einer schlechten Signal-Rausch-Statistik war σ_D in lateraler (x, y) Richtung ± 30 nm, in axialer Richtung ± 75 nm; bei guter Signal-Rausch-Statistik (32-mal Scannen der Quarzglasobjekte) war σ_D nur noch ± 15 nm lateral bzw. ± 60 nm axial. Bei einer Rausch-Statistik, die derjenigen von fluoreszenzmarkierten Chromatintargets in Zellkernen entsprach [106], ergaben sich für die Quarzglasobjekte $\sigma_D = \pm 20$ nm lateral und ± 55 nm axial (die bei beliebiger räumlicher Orientierung der Targets sich ergebenden mittleren Distanzfehler entsprechen bis auf wenige nm den axialen Werten).

Die angegebenen Fehler der Distanzmessung enthalten noch Fehler aufgrund der Variation des Durchmessers der Quarzglasobjekte. Simulationsrechnungen unter Verwendung des experimentell bei fluoreszenzmarkierten Chromatintargets beobachteten Rauschens und unter Einbeziehung der gleichen Bildanalysealgorithmen ergaben bei Annahme identischer Durchmesser der Quarzglasobjekte eine Verringerung des lateralen Distanzmessfehlers von 20 nm auf 15 nm, sowie des axialen Distanzmessfehlers von 55 nm auf 35 nm. Auf dieser Basis durchgeführte weitere Simulationsrechnungen ließen bei verbesselter Fluoreszenzphotonenstatistik einen Rückgang des lateralen Dis-

tanzmessfehlers auf ca. 2 nm sowie des axialen Distanzmessfehlers auf ca. 10 nm erwarten (Bornfleth et al., unveröffentlichte Resultate).

Axialtomographische Distanzmessungen mit Fluoreszenzbeads gleicher spektraler Signatur. Die genannten Messungen ergaben, dass bei der CLSFM die Fehler der Distanzmessung bei Fluoreszenztargets, die sich in derselben (lateralen) Ebene befinden, minimiert sind: Die xy -Skalierung der Schrittweite kann mit einer Genauigkeit besser als 2 nm erfolgen; der Positionierungsfehler von Einzeltargets beträgt bei guten Bedingungen (Fluoreszenzbeads von geeignetem Fluorochromgehalt) ebenfalls nur wenige nm. Aus einfachen geometrischen Überlegungen ergibt sich ferner, dass bei axialtomographischer Drehung des Objekts (nach Korrektur etwaiger chromatischer oder fokaler Verschiebungen) die maximale laterale Distanz $D_{xy,\max}$ zwischen zwei relativ zueinander fixierten Fluoreszenztargets dann beobachtet wird, wenn sich beide in derselben (lateralen) Ebene befinden. Diese ist demnach auch der euklidische („wahre“) 3D-Abstand: $D_{xy,\max} = D_{\text{eucl},xyz}$.

Aus den obigen Überlegungen ergeben sich verschiedene Konsequenzen für Distanzmessungen:

1. Der euklidische 3D-Abstand ist gleich der *maximalen* lateralen (x, y) Distanz (ggf. nach Korrekturen), die bei Drehung des Objekts beobachtet wird; in diesem Fall ist die axiale (z)-Distanz minimal [81].
2. Der in (1) gemessene 3D-Abstand kann unter den gegebenen Bedingungen mit einem Fehler von wenigen nm bestimmt werden; misst man zunächst den Abstand zwischen zwei Fluoreszenztargets, die sich auf einer Glasfaser in einer (lateralen) Ebene befinden, so kann durch Rotation der Glasfaser und erneute Messung der (scheinbaren) Abstände zwischen den Targets die Fokusverschiebung mit einer hohen Genauigkeit gemessen werden.
3. Von denselben, auf einer Glasfaser/in einer Glaskapillare befindlichen fixierten Targets können durch Rotation verschiedene konfokale 3D-Abstandsmessungen durchgeführt werden; die Standardabweichung (σ_{tom}) vom gemessenen Distanzmittelwert gibt (vor Korrekturen) eine erste *obere* Schätzung des Distanzmessfehlers. Können die gefundenen Distanzwerte zwischen zwei fluoreszenzmarkierten zellulären Targets aufgrund unabhängiger Messungen (z.B. von Fluoreszenzbeads) korrigiert werden, so sind verbesserte Schätzungen des Distanzmessfehlers möglich.

Als Beispiel für axialtomographische CLSFM-Distanzmessungen hoher Präzision seien hier Messungen an FITC-Fluoreszenz-Beads von 1 μm Durchmesser erwähnt, deren 3D-Distanzen unter 5 verschiedenen Rotationswinkeln vermessen wurden [10]. Dabei wurden (ohne Korrekturen) bei günstiger Lage zwischen den FITC-Fluoreszenzbeads σ_{tom} -Werte kleiner 10 nm gemessen.

Korrektur der chromatischen Verschiebung: Möglichkeiten einer Distanzmessung jenseits Abbe. Bei Anwendungen der konfokalen Mikroskopie in der

Genomforschung ist es für zahlreiche Anwendungen wesentlich, die chromatische Verschiebung mit hoher Präzision unter den jeweils gegebenen Bedingungen zu messen. Ein erstes Beispiel betrifft die Messung der Abstände zwischen differentiell fluoreszenzmarkierten subchromosomalen R-Bandendomänen und G-Bandendomänen [106]. Eine zweite Anwendung von erheblicher Tragweite für die Genomforschung stellt die Möglichkeit einer *spektralen Hochpräzisionsmikroskopie* jenseits des Abbe-Limits dar [5, 61].

Die spektrale Hochpräzisionsmikroskopie geht von der seit einem Jahrhundert bekannten Tatsache aus, dass der geometrische Bildort eines isolierten selbstleuchtenden punktförmigen Objekts durch das Maximum der Intensitätsverteilung des Beugungsgebildes gegeben ist. Da bei einer symmetrischen Intensitätsverteilung der Ort dieses Maximums seinerseits durch den Schwerpunkt der Verteilung bestimmt werden kann, kann auch bei Pixel-/Voxelgrößen im Bereich der FWHM bei geeigneter Signal-Rausch-Statistik die geometrische Bildposition mit einer Präzision $\ll \lambda$ bestimmt werden. Experimentell wurden z.B. Positionierungspräzisionen von wenigen nm erreicht. Wenn zwei Fluoreszenztargets eine *verschiedene* spektrale Signatur mit geringem Cross-Talk besitzen, können die von ihnen erzeugten Beugungsbilder unabhängig voneinander registriert werden, auch wenn der Abstand zwischen den Targets kleiner ist als die relevante FWHM. Da unter den gemachten Voraussetzungen der geometrische Ort jedes der beiden Targets voneinander unabhängig mit einem Fehler von wenigen nm (ggf. noch besser) bestimmt werden kann, sollten auf diese Weise Distanzmessungen zwischen den Intensitätsschwerpunkten differentiell fluoreszenzmarkierter Targets mit einer vergleichbar hohen Präzision auch dann noch möglich sein, wenn sich beide Targets innerhalb des gleichen (konfokalen) Beobachtungsvolumens befinden und ihre Beugungsbilder sich daher stark überlappen. Wird unter *Auflösung* die kleinste Distanz zwischen zwei Objekten verstanden, die noch detektiert werden kann, so kann auf diesem Wege die so definierte Auflösung erheblich über das von Abbe angebene und durch die FWHM der PSF quantitativ beschreibbare Maß hinaus gesteigert werden. Da jedoch der Begriff *Auflösung* üblicherweise in meist impliziter Weise mit der kleinsten messbaren Distanz zwischen zwei Objekten *gleicher* spektraler Signatur verbunden wird, soll im Folgenden die kleinste messbare Distanz zwischen zwei Objekten *verschiedener* spektraler Signatur als *auflösungssäquivalent* bezeichnet werden. In Ergänzung des Begriffs *Präzisionsdistanzmessung* macht diese Bezeichnung deutlich, dass mit Hilfe solcher Messungen zwischen Objekten verschiedener spektraler Signatur tatsächlich Struktureinzelheiten erkannt, d.h. *aufgelöst* werden können, die jenseits der von Abbe formulierten Grenzen liegen:

Werden statt nur zwei Targets eine Reihe fluoreszenzmarkierter Targets verschiedener spektraler Signatur innerhalb des Beobachtungsvolumens (z.B. eines CLSFM) vermessen, so können aus den mit einer Präzision $\ll \lambda$ gemessenen Einzeldistanzen die räumlichen Beziehungen der multispektral markierten Targets zueinander rekonstruiert werden, d.h. ihre Topologie kann bestimmt

werden. Damit würde es die spektrale Hochpräzisionsmikroskopie erlauben, über die reine Messung von Einzeldistanzen hinaus auch *Struktureinzelheiten* weit unterhalb des Abbe-Limits der Lichtmikroskopie zu analysieren. Dies wäre dann möglich in dreidimensional konservierten („intakten“) Zellkernen, im Gegensatz zu den oberflächenorientierten Ultrastrukturverfahren der Elektronenmikroskopie sowie der Nahfeldmikroskopie. Im Unterschied zu röntgenmikroskopischen Ansätzen wären sogar Ultrastrukturuntersuchungen des Genoms *in vivo* denkbar.

Offensichtlich hängt die Realisierung eines derart erhöhten Auflösungsäquivalents ganz wesentlich auch von der Genauigkeit ab, mit der die chromatische Verschiebung experimentell bestimmt werden kann; dies ist zumindest dort der Fall, wo zur Fluoreszenzanregung Licht unterschiedlicher Wellenlänge zum Einsatz kommt. Es muss dann gewährleistet werden, dass die bei der Bildaufnahme biologischer Objekte tatsächlich gegebene chromatische Verschiebung mit der zuvor gemessenen im Rahmen des Messfehlers übereinstimmt.

Eine Möglichkeit, die chromatische Verschiebung mit hoher Präzision im CLSFM zu messen, besteht in der Verwendung polychromatischer Fluoreszenzbeads; als Beispiel wurden von solchen Beads erzeugte Intensitätsverteilungen (z.B. FITC-Fluoreszenz, TRITC-Fluoreszenz) in den vorgesehenen FITC-/TRITC-Kanälen gemessen, segmentiert, und die jeweiligen Schwerpunkte bezogen auf die Objektebene bestimmt [5, 82]. Dabei ergaben sich auch bei demselben Objektiv erhebliche Unterschiede in den chromatischen Verschiebungen je nach den optischen „Mikro“bedingungen (z.B. verwendetes Einbettungsmedium, Deckglasdicke, Immersionsöl etc.); bei gegebenen Bedingungen jedoch waren die erhaltenen Standardabweichungen vom Mittelwert der chromatischen Verschiebung von einer ähnlichen Größe wie die Positionierungsfehler.

In ersten CLSFM-Hochpräzisionsdistanzmessungen zwischen Objekten *verschiedener* spektraler Signatur (H. Bornfleth, unveröffentlichte Resultate) wurden Quarzglasbeads mit einem grün fluoreszierenden FITC-Kern (Kern ca. 400 nm Durchmesser; mittlerer Gesamtdurchmesser 1052 nm) mit Quarzglasbeads mit einem rot fluoreszierenden RITC-Kern (Kerndurchmesser 200 nm; mittlerer Gesamtdurchmesser ca. 400 nm) gemischt. Die Aufnahmebedingungen wurden so gewählt, dass das Rauschen den bei fluoreszenzmarkierten Chromatinregionen beobachteten Werten entsprach. Für die Messung der axialen (z) chromatischen Verschiebung wurden die mittleren z -Werte der FITC-Intensität von Ansammlungen grün fluoreszierender sowie von davon getrennt liegenden Ansammlungen RITC-fluoreszierender Quarzglaskugeln auf einem (als eben angenommenen) Objekträger bestimmt. Die so erhaltene chromatische Verschiebung wurde zur Korrektur der gemessenen axialen Positionen von jeweils sich berührenden Quarzglaskugeln verschiedener spektraler Signatur (FITC-RITC) verwendet. Auf eine Korrektur der lateralen chromatischen Aberration wurde hier verzichtet, da diese unter

den gegebenen optischen Bedingungen im Rahmen des Positionierungsfehlers lag [82]. Die auf diese Weise experimentell erhaltenen 3D-Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten der sich berührenden FITC-RITC Beads wurden mit den aufgrund der Herstellerangaben erwarteten Distanzen ($734 \pm 8 \text{ nm}$) verglichen. Der so ermittelte Fehler der 3D-Distanzmessung zwischen Targets *verschiedener* spektraler Signatur lag für FITC-RITC-Distanzen direkt unter dem objektivseitigen Deckglas bei ca. 27 nm; für FITC-RITC-Distanzen von ca. 9 μm unterhalb des Deckglases lag er bei ca. 33 nm. Diese mit Simulationsrechnungen kompatiblen Messungen belegten erstmals experimentell, dass mit Hilfe von CLSFM 3D-Distanzmessungen zwischen den Intensitätsschwerpunkten fluoreszenzmarkierter Objekte *verschiedener* spektraler Signatur mit einer Genauigkeit möglich sind, die wenigen Nukleosomen-durchmessern entsprechen.

Volumen- und Oberflächenmessungen mit Fluoreszenzbeads. Da für die Genomforschung Volumen- und Oberflächenmessungen von fluoreszenzmarkierten Targets in Zellkernen (z.B. Chromosomenterritorien, chromosomale Domänen in Abhängigkeit von der genetischen Aktivität) von Interesse sind, sind experimentelle Kalibrierungsmessungen zu diesen Größen an Objekten bekannter Geometrie wünschenswert. Hierzu wurden konfokale 3D-Datensätze von Fluoreszenzbeads in verschiedenen Positionen (relativ zum registrierenden Objektiv) experimentell registriert und mit verschiedenen Verfahren (Cavalieri-Segmentierung; Voronoi-Tessellierung) ausgewertet. Die so erhaltenen Mittelwerte für Volumina und Oberflächen stimmten bei Cavalieri-Segmentierung besser mit den aus den Beadradien bestimmten Werten überein als bei Voronoi-Tessellierung, wie dies bei der gewählten Form der Testobjekte auch zu erwarten war. Jedoch ergab sich auch bei der Cavalieri-Segmentierung kleiner Fluoreszenzbeads ein erheblicher Einfluss der optischen „Mikrobedingungen“ auf die scheinbaren Volumina und Oberflächen [82]. Diese an klar definierten Testobjekten konstanter Morphologie beobachteten scheinbaren Variationen zeigen, dass die an fluoreszenzmarkierten Targets im Zellkern beobachtete Variabilität von Volumen und Oberfläche (z.B. [35, 79]) zum Teil die Folge von Bildaufnahme- und Segmentierungsproblemen sein können und daher mit Vorsicht zu interpretieren sind.

8.2.6 Modelle zur Architektur von Zellkern und Chromosomen

In welchem Maß die konfokale 3D-Mikroskopie zu relevanten Fortschritten in der Genomforschung beitragen kann, hängt in hohem Maß auch von der Entwicklung testbarer Modellvorstellungen ab. Insbesondere sollten derartige Modelle quantitative Voraussagen zu grundsätzlich messbaren Parametern liefern, wie z.B. den Distanzen zwischen bestimmten Chromosomenabschnitten, der Verteilung von Chromosomen im Zellkern, oder der Induktion von Chromosomenveränderungen durch ionisierende Strahlung, Doppelstrangbrüche (DSB) induzierende Enzyme, oder chemische Agentien. Die

quantitativen Voraussagen solcher Modelle können dann mit quantitativen experimentellen Ergebnissen verglichen und bestimmte Modelle auf dieser Grundlage verworfen oder weiter verfeinert werden. Langfristiges Ziel ist es, quantitative Strukturfunktionsmodelle des Genoms zu berechnen. Als Beispiele für den gegenwärtigen Stand der Entwicklung testbarer Modelle der 3D-Genomorganisation seien hier genannt:

„Random-Walk“-Modelle. In dem ursprünglichen Random-Walk-Modell [96] wurde angenommen, dass ein Interphasechromosom sich verhält wie ein langes, flexibles Polymer. Aus dieser Annahme ergaben sich erstmals quantitativ testbare Konsequenzen für die Abstände zwischen bestimmten chromosomalen Sequenzen. Beispielsweise sollte der mittlere Abstand zwischen den Telomeren (Enden) eines mittelgroßen Chromosoms im menschlichen Zellkern dessen Durchmesser erreichen oder sogar übersteigen.

In einer *Random Walk/Giant Loop* genannten Weiterentwicklung des Random-Walk-Modells [84, 104] wurde angenommen, dass in bestimmten linearen Abständen (in der Größe von einigen Megabasenpaaren) der geometrische Abstand zwischen diesen Stellen der flexiblen Chromatinfaser Null wird; d.h. es werden große Schleifen (Loops) gebildet, wie sie z.B. durch „Linker“-Proteine realisiert werden können. Aufgrund dieser zusätzlichen Annahmen wird beispielsweise der mittlere Abstand zwischen den Telomeren eines mittelgroßen menschlichen Chromosoms auf Werte wesentlich kleiner als der Zellkerndurchmesser reduziert.

Zur verbesserten Modellierung der Topologie von Chromosomenterritorien wurde kürzlich ein von dem Random-Walk-/Giant-Loop-Modell ausgehendes Modell (Multi-Loop-Subcompartment-(MLS-)Modell [69]) entwickelt, in dem das Chromatin eines Chromosoms als ein flexibles, volumenexklusives Polymer mit Loops unterschiedlicher Größe (bis hinunter zu 120 kbp) modelliert wurde, die in geeignet dimensionierten Subkompartimenten gehäuft waren. Während das Random-Walk-/Giant-Loop-Modell erhebliche mittlere Überlappungsvolumina zwischen bestimmten Subkompartimenten desselben Chromosomenterritoriums erwartet ließ, ergaben sich aus dem MLS-Modell erheblich kleinere mittlere Überlappungsvolumina.

Verteilungen von Chromosomen. Auf der Grundlage einfacher geometrischer Modelle wurden erste Monte-Carlo-Verteilungen von Chromosomenterritorien in Zellkernvolumina berechnet [68]: Zum Beispiel wurden der Zellkern und die Chromosomenterritorien in ihm durch sphärische oder ellipsoide Volumina mit einem Volumen proportional zum jeweiligen DNA-Gehalt angenähert; subchromosomale Targets wurden als punktförmig angenommen.

In einem weiterentwickelten Modell, dem *Sphärische Subdomänenmodell* [27], wurden Modelle ganzer menschlicher Kerne in folgender Weise berechnet: In der Startkonfiguration wurden die 46 Territorien eines menschlichen

Zellkerns als kompakte, globuläre Strukturen simuliert, die aus gegeneinander in bestimmtem Maß verschiebbaren kleinen sphärischen Elementen (entsprechend etwa einem Megabasenpaar) aufgebaut angenommen wurden. Gestalt und Position der Modellterritorien im Kern wurde dann solange verändert, bis auf der Grundlage der angenommenen Interaktionskräfte (zwischen verschiedenen Territorien als abstoßend angenommen) ein Gleichgewicht eintrat. Aus solchen, bereits rechenaufwendigen Modellen konnten z.B. quantitative Voraussagen zu Position, Oberfläche, Rundheit und Nachbarschaftsbeziehungen bestimmter Chromosomenterritorien gewonnen werden. Ferner konnten quantitative Voraussagen über die Abhängigkeit der durch ionisierende Strahlung induzierten relativen Translokationsraten gewonnen werden.

Modelle zur allgemeinen Topologie der Genomstruktur: Das ICD-Modell. Auf der Grundlage des in der Literatur beschriebenen Forschungsstands sowie eigener experimenteller Beobachtungen und theoretischer Überlegungen wurde als Arbeitshypothese von P. Lichter, T. Cremer und C. Cremer ein Modell für die dreidimensionale funktionelle Genomstruktur im Zellkern entwickelt, das *Interchromosomal-Domain*-Modell (ICD). In ihrer Gesamtheit zeigen vielfältige Beobachtungen der letzten Jahre (von denen einige Ergebnisse oben zusammengefasst wurden), dass der Zellkern von normalen Säugerzellen (vermutlich von Eukaryonten überhaupt) eine räumlich und funktionell hoch kompartimentalisierte Struktur besitzt. Diese Struktur muss nach jeder Zellteilung innerhalb von wenigen Stunden wiederhergestellt werden.

Gegenwärtig werden verschiedene Typen von Modellen für die Zellkernstruktur diskutiert, wie z.B. das bereits genannte Random-Walk-/Giant-Loop-Modell [84, 104] der Chromosomenterritorien. Es erlaubte zum ersten Mal quantitativ testbare Voraussagen zur Topologie von Territorien.

Ein anderer Grundtypus von Modellen nimmt die Existenz von „Kanälen“ zwischen dem Chromatin des Zellkerns an, in dem metabolisch wichtige Prozesse stattfinden können [4, 18, 93, 105]. Derartige Modelle wurden kürzlich zu einem „Channel“-Modell der Nuclear-Matrix-Struktur weiterentwickelt, in dem diese Kanäle und die Nuclear Matrix räumlich zusammenfallen [77, 107].

Das Inter-Chromosomal-Domain-(ICD-)Modell des Zellkern stellt einen ersten, als Arbeitshypothese gedachten Versuch dar, ein funktionelles 3D-„Channel“-Modell der Kernorganisation auf der Grundlage elektrophysiologischer Interaktionen zwischen Chromosomenterritorien zu entwickeln [26, 27].

Dieses Modell geht aus von einem spezifischen „Channel“-Grund-Modell des Zellkerns [26, 107]. Es nimmt an, dass Transkription, Splicing, Replikation und Reparatur der DNA, sowie der RNA-Transport zu den Kernporen, innerhalb eines Inter-Chromosomal-Domain(ICD)-Kompartiments stattfindet. Das 3D-Kanal-Netzwerk des ICD-Kompartiments wird gebildet durch die

Oberflächen der Chromosomenterritorien; aufgrund einer vermutlich komplex gefalteten Oberfläche können sich seine Verzweigungen von der einhüllenden Peripherie ins Innere der Territorien bis zu einzelnen dort lokalisierten Chromatindomänen fortsetzen. Werden in den benachbarten Oberflächen verschiedener Territorien Doppelstrangbrüche induziert, z.B. durch ionisierende Strahlung, so können durch deren Reparatur („illegitime“ Rekombination) strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen, z.B. Translokationen [27].

Eine unmittelbare Konsequenz der im ICD-Modell postulierten Lokalisation von Genen liegt in einer möglichen, erheblichen *funktionellen* Bedeutung nichtkodierender DNA. Im Unterschied zu einer allgemeinen Würdigung der strukturellen Bedeutung nichtkodierender DNA [63, 97] wird hier der nichtkodierenden DNA die (zusätzliche) spezifische strukturelle Funktion zugeordnet, eine Lokalisierung von zu transkribierenden DNA-Abschnitten (bzw. DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren) an der Oberfläche der Territorien sicherzustellen. Demnach könnten Mutationen im Bereich der nichtkodierenden DNA wesentliche funktionelle Konsequenzen haben, wenn sie z.B. durch eine lokale Änderung der Oberflächentopologie eines Territoriums zu einer veränderten Anbindung von Transkriptionsfaktoren führen.

Eine weitere unmittelbare Konsequenz des ICD-Modells ist die Möglichkeit, den Funktionszustand des Chromatins durch eine räumliche Verschiebung von DNA-Sequenzen zu beeinflussen. Beispielsweise könnten Gene durch räumliche Lokalisation transkriptionsrelevanter Sequenzen an der Oberfläche des Territoriums für eine Bindung von Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht und damit *aktiviert* bzw. durch Verschiebung der Bindungssequenzen ins Innere des Territoriums *inaktiviert* werden. Damit würde der *Topologie* der Chromatinstruktur in Chromosomenterritorien eine erhebliche funktionelle Bedeutung zukommen. Bei der postulierten dynamischen Modifikation der funktionellen Chromatinstruktur ist eine wesentliche Beteiligung spezifischer Proteine und Proteinkomplexe wahrscheinlich [53, 71, 72].

8.3 Ergebnisse

8.3.1 Ausdehnung individueller Chromosomenterritorien im Zellkern: Vergleich mit quantitativen Voraussagen

Wird auf der Grundlage von Distanzmessungen zwischen relativ nahe benachbarten Genen (bis zu ca. ein bis einigen Megabasenpaaren) aufgrund des Random-Walk-Modells [96] eine Extrapolation zu Distanzen zwischen weit entfernten chromosomalen Sequenzen (z.B. Telomeren) vorgenommen, so ist die erwartete mittlere Distanz etwa so groß oder noch größer wie der Zellkerndurchmesser. Aus Lasermikrobestrahlungsexperimenten *in vivo* [24, 108] sowie aus lichtmikroskopischen Beobachtungen *in situ* aufgrund von Chromosome Painting (Übersicht: [26]) ergaben sich hingegen maximale chromosomale Distanzen, die wesentlich *geringer* waren als die Ausdehnung der untersuchten Säugerzellkerne. Demnach kann die Struktur eines Interphasechromo-

soms als Ganzes nicht einfach die eines flexiblen Polymers sein. Bei Anwendung des Random-Walk-/Giant-Loop-Modells [84, 104] hingegen folgt eine mittlere Ausdehung eines Chromosomenterritoriums in menschlichen Zellen von einigen μm ; dies ist in sehr viel besserer Übereinstimmung mit den experimentellen Beobachtungen.

Für die Territorien von #7 und #X beispielsweise ergaben sich als absolute Schätzungen für das einhüllende Volumen nach Chromosomenpainting, konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und 3D-Bildverarbeitung Werte um 20–30 μm^3 [3, 33, 35, 79]. Dies ist um ein Vielfaches weniger, als in einem auf der Grundlage des „Random-Walk“-Modells computersimulierten „extended model“ (G. Kreth, C. Muenkel, J. Langowski, C. Cremer, unveröff. Ergebnisse) zu erwarten gewesen wäre.

8.3.2 Exklusivität der Chromosomenterritorien

Die räumliche Exklusivität der Chromosomenterritorien bedeutet, dass sich verschiedene benachbarte Chromosomenterritorien nicht gegenseitig durchdringen; ihre möglicherweise existierenden Überlappungszonen werden als gering im Vergleich zu den Gesamtvolumina der Territorien angenommen. Eine derartige Hypothese wurde bereits vor zwei Jahrzehnten der Interpretation strahlenbiologischer Resultate zu Grunde gelegt [85]; ein direkter Beweis jedoch war damals nicht möglich.

Für erste direkte Untersuchungen zur Exklusivität von Chromosomenterritorien in menschlichen Zellen wurden konfokale Aufnahmen von weiblichen Zellkernen nach Painting der Territorien von #X und #7 gemacht. In Zellkernen, in denen Territorien von #X und #7 möglichst nahe benachbart waren, wurden mit Hilfe des Voronoi-Tessellierungsverfahrens die einhüllenden Volumina von #X und #7 bestimmt und ihre Überlappungszonen ermittelt. Die Ergebnisse zeigten eine nur geringe Überlappung der einhüllenden Volumina der benachbarten Territorien [27, 35]. Inwieweit die registrierten, kleinen Überlappungszonen wirklich existieren und inwieweit sie ein optisches und bildanalytisches „Artefakt“ (z.B. aufgrund der limitierten optischen Auflösung oder aufgrund von Segmentierungsproblemen) darstellen, bedarf noch näherer Untersuchung. In jedem Fall sprechen die experimentellen Resultate für einen hohen Grad von räumlicher Exklusivität von Chromosomenterritorien in normalen menschlichen Zellen.

8.3.3 Morphologie von Chromosomenterritorien

Für Untersuchungen zur Gestalt von Chromosomenterritorien und ihre möglicherweise bestehende Korrelation mit der funktionellen Organisation des Zellkerns bieten sich die X-Chromosomen in Säugerzellen an: In weiblichen somatischen Zellkernen ist eines von diesen (Xa) genetisch voll aktiv; das zweite X-Chromosom (Xi) im selben Zellkern ist hingegen genetisch weitgehend inaktiv, d.h. nur wenige Gene entgehen der Abschaltung durch einen

Inaktivierungsmechanismus. Mit DNA-Farbstoffen wie z.B. DAPI oder im Phasenkontrast an ungefärbten Zellen ist nur das inaktive Xi sichtbar. Dies wurde allgemein so interpretiert, dass das Xi sehr viel stärker kondensiert ist (bis zu einem Faktor 5- bis 10-mal) als das Xa; dieses sollte demnach ein sehr viel größeres Gesamtvolumen besitzen als das Xi. Chromosomenpainting in Verbindung mit dreidimensionaler Mikroskopie und Bildverarbeitung machten erstmals eine experimentelle, quantitative Überprüfung dieser Annahme möglich.

Chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken des menschlichen X-Chromosoms, konfokale Fluoreszenzmikroskopie und 3D-Bildverarbeitung wurden dazu verwendet, Volumen, Oberfläche und Rundheit des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms in weiblichen menschlichen Zellen quantitativ zu bestimmen. Zunächst wurden von jedem untersuchten Zellkern optische Schnitte registriert; anschließend wurden diese mit dreidimensionalen Bildanalyseverfahren analysiert. Erste, interaktive Volumenbestimmungen mit Hilfe des Cavalieri-Estimators [3] ergaben überraschenderweise, dass die beiden X-Territorien, von wenigen Ausnahmen abgesehen, ein ähnliches mittleres Volumen hatten (innerhalb eines Faktors von ca. 1,5). Dieses schien mit der üblichen Vorstellung eines sehr starken Unterschieds im mittleren Kondensationsgrad schwer vereinbar zu sein. Eine denkbare Fehlerquelle bestand in der interaktiven Schwellwertfestsetzung. Um dies auszuschließen, wurde in weiteren Analysen der Schwellwert automatisch im gesamten infrage kommenden Bereich variiert; für jeden Kern wurden die Mittelwerte der Territorienvolumina bestimmt. Auch bei diesem Verfahren ergab sich nur ein geringer Unterschied der beiden mittleren Volumina [79].

In neueren Untersuchungen (P. Edelmann, B. Rinke, S. Dietzel, T. Cremer, C. Cremer, unveröffentlichte Ergebnisse) an einer Serie von menschlichen Zellkernen mit einer individuellen Identifizierung von Xi durch DAPI-Färbung ergab das automatische Cavalieri-Verfahren, dass im Mittel das Volumen von Xa um den Faktor 1,2 größer war als das Xi (Unterschied nicht signifikant); die gesamte segmentierte mittlere Oberfläche von Xa war hingegen um einen Faktor von ca. 1,4 größer, und die Rundheit (proportional zu Volumen²/Oberfläche³) von Xi war ca. doppelt so groß wie diejenige von Xa (Unterschiede hochsignifikant).

Eine konsequente Interpretation dieser Ergebnisse besteht in der Annahme, dass die Territorien von Xi und Xa in den untersuchten, proliferationsaktiven Zellen ein ähnliches *Volumen* hatten, während die *Oberfläche* von Xa beträchtlich größer war als diejenige von Xi; die Rundheit von Xa ist daher wesentlich geringer: dies bedeutet, dass aktives und inaktives X-Chromosom sich in Oberfläche und Rundheit, nicht aber (oder nur wenig) in ihrem Gesamtvolume unterschieden.

Eine alternative, wenn auch bei den verwendeten Markierungsbedingungen wenig wahrscheinliche Interpretationsmöglichkeit der Cavalieri-Daten wäre eine starke unterschiedliche Heterogenität der Farbstoffverteilung bei Xi

und Xa; in diesem Fall könnte der durch die Markierung festgestellte mittlere Kondensationsgrad von Xa sehr viel geringer gewesen sein als der von Xi; d.h. das einhüllende Volumen von Xa könnte in Wirklichkeit doch sehr viel größer gewesen sein als dasjenige von Xi. Diese alternative Interpretation konnte mit Hilfe eines Voronoi-Tessellierungsverfahrens ausgeschlossen werden, mit dem die einhüllenden Volumina und Oberflächen der beiden X-Territorien in weiblichen menschlichen Zellkernen gleichen Typs (mit und ohne spezielle Identifizierung von Xi und Xa durch DAPI-Färbung) identifiziert werden konnten. Die erzielten Ergebnisse waren mit denjenigen der Cavalieri-Auswertung fast identisch [33, 35].

In jüngster Zeit wurde das oben beschriebene Cavalieri-Auswertungsverfahren auch auf die quantitative 3D-Analyse konfokaler Aufnahmen von weiblichen Mausneuronenzellen nach Painting der beiden X-Chromosomen angewandt (P. Edelmann, A. Jauch, T. Cremer, C. Cremer, unveröff. Ergebnisse). Wiederum hatten in den Zellkernen die beiden X-Chromosomen sehr ähnliche Volumina; die vorliegenden Resultate sprechen jedoch dafür, dass in diesen teilungsinaktiven Zellen möglicherweise existierende Unterschiede in Oberfläche bzw. Rundheit sehr viel geringer sind als in den Kernen der o.g. teilungsaktiven menschlichen Zellen.

Die bislang vorliegenden Ergebnisse quantitativer, vergleichender morphologischer Messungen an genetisch aktiven (Xa) und genetisch weitgehend inaktiven Chromosomen (Xi) sprechen dafür, dass der allgemeine mittlere Kondensationsgrad (die mittlere Dichte) der Chromosomenterritorien für ihre genetische Aktivität offenbar nicht der entscheidende Faktor ist. Diese Hypothese wäre kompatibel mit biochemischen und molekularbiologischen Unterschieden in Xa und Xi, wie z.B. einer funktionellen Rolle von XIST-RNA [19]: Eine mögliche (hypothetische) Interpretation auf der Grundlage des ICD-Modells wäre eine Änderung der (Oberflächen-)Topologie des betroffenen Chromosomenterritoriums, sodass der Zugang von Transkriptionsfaktoren verändert würde. Dieser Arbeitshypothese zufolge würde eine wesentliche funktionelle Wirkung biochemischer/molekularbiologischer Agentien in ihrem Einfluss auf die (lokale) Genomtopologie liegen, analog zu den bereits seit langem bekannten induzierbaren Konformationsänderungen anderer biologischer Makromoleküle. Eine weitere naheliegende, derzeit ebenfalls noch hypothetische Interpretation wäre die Annahme eines Zusammenhangs zwischen Rundheit und Replikation der X-chromosomalen DNA: Diese erfolgt in teilungsaktiven Zellen bei Xa früher als bei Xi, während sie in teilungsinaktiven Zellen normalerweise entfällt.

Selbstverständlich schließen diese Messungen die Möglichkeit nicht aus, dass Kondensationsänderungen in Teilen der Chromosomen ebenfalls entscheidend für ihre genetische Aktivität sind. Zur Untersuchung dieser Frage sind weitere Untersuchungen der Topologie von Xi und Xa erforderlich.

8.3.4 Topologie der Chromosomenterritorien

Gibt es in den Chromosomenterritorien eine spezifische dreidimensionale Verteilung von Genen, d.h. haben die Chromosomenterritorien eine Topologie auf der Ebene spezifischer subchromosomaler DNA-Abschnitte?

Eine extreme Hypothese hierzu wäre, dass die Topologie der Chromosomenterritorien bei gleichem Funktionsstatus einer ähnlich hohen Einschränkung unterliegt wie bei vielen anderen biologischen Makromolekülen; d.h. die räumliche Faltung zum mindesten von funktionell relevanten chromosomalen Subregionen (Domänen) würde in ganz spezifischer Weise erfolgen. Eine alternative, extreme Hypothese wäre, dass sich die Abstände zwischen beliebigen DNA-Abschnitten desselben Territoriums ähnlich wie bei langkettigen Polymeren in fast beliebiger Weise verändern können.

Messungen der projizierten (lateralen) 2D-Abstände zwischen spezifisch durch FISH markierten DNA-Sequenzen desselben Chromosomenterritoriums in menschlichen Zellkernen waren kompatibel mit einem Random-Walk-Modell (bei kleineren Abständen) bzw. mit einem Random-Walk-/Giant-Loop-Modell (bei größeren Abständen [96, 104]). In diesem Fall nimmt die räumliche Distanz zwischen zwei Genen auf dem Chromosom mit ihrem linearen Abstand (in Basenpaaren) zwar zu, ist sonst aber innerhalb des Territoriums außerordentlich variabel; von einer spezifischen, funktionell bedeutsamen Topologie könnte hier kaum gesprochen werden.

Andere experimentelle Ergebnisse hingegen sprechen für einen weitergehenden Grad von Ordnung:

1. Ein differentielles Painting von Armen von Chromosomenterritorien mit Hilfe von chromosomarm-spezifischen DNA-Bibliotheken zeigte, dass die Chromosomenarme weitgehend voneinander separiert bleiben und ihre Überlappungszonen relativ gering sind [23]. Dieser Befund ist mit dem Random-Walk-/Giant-Loop-Modell nicht vereinbar [69]. Beobachtungen von kleinen chromosomalen Abschnitten auf dem langen (Xq) und kurzen (Xp) Arm des X-Chromosoms in weiblichen, normalen Zellkernen nach Painting zeigten eine weitgehende „Kompaktheit“ dieser Abschnitte in den Territorien [27, 35].
2. In einer Reihe von Fällen nach FISH-Markierung von Chromosomenterritorien und zugehörigen Genen wurden diese bzw. ihre Transkripte konsistent an der Oberfläche der Territorien beobachtet [23, 54, 107]. Eine quantitative Analyse von menschlichen Zellkernen nach Painting von Chromosom 8 und des c-myc-Protoonkogens, konfokaler 3D-Mikroskopie und Voronoi-Tessellierung der Territoriooberfläche ergab eine Lokalisierung auch des c-myc-Protoonkogens nahe an der Oberfläche der Territorien [34].
3. Gleichzeitige Markierung von Chromosomenterritorien und Faktoren von Splicing-Komplexen ergab eine hochsignifikante Häufung der Orte der Splicing-Faktoren in der Peripherie der Territorien [107].

4. Es wurden konfokale Messungen an Zellkernen durchgeführt, in denen die Territorien von Xa und Xi mit einer spektralen Signatur 1 markiert waren, während auf ihnen befindliche Gene (Ant 2 und Ant 3) mit anderen spektralen Signaturen markiert waren (S. Dietzel, T. Cremer et al., Mansuskript in Vorber.). Eine quantitative Analyse der CLSM-Daten mit den Methoden der spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie ergibt eine auf Xa bzw. Xi unterschiedliche Topologie der Anordnung dieser beiden Gene. Der mit einem Cavalieri-Segmentierungsverfahren bestimmte mittlere Fehler der 3D-Positionierung betrug dabei weniger als 40 nm, also nur wenige Prozent der Ausdehnung der X-Chromosomenterritorien (P. Edelmann, S. Dietzel, T. Cremer, C. Cremer, unveröffentlichte Ergebnisse).
5. Menschliche Metaphasechromosomen zeichnen sich aus durch eine spezifische strukturelle Organisation, die sich aufgrund differentieller Färbeverfahren (Bänderung) erkennen lässt. Während jedoch die sog. G-Banden nur ca. 20% der Gene eines Chromosoms enthalten, befinden sich in den R-Banden rund 80% der Gene. Außerdem sind die meisten der von jeder Zelle benötigten „Haushaltsgene“ in den R-Banden angesiedelt, während Gewebe- oder Entwicklungsspezifische Gene oft in den G-Banden vorkommen. Um möglicherweise existierende Unterschiede der topologischen Position in den Chromosomenterritorien zwischen den in diesen Banden befindlichen beiden Arten von Genen untersuchen zu können, war als ein erster Schritt die experimentelle Analyse der 3D-Verteilung von R- und G-Bandendomänen in Chromosomenterritorien wünschenswert. Diese gelang mit Hilfe von differentiellen Fluoreszenzmarkierungsverfahren, bei denen die R-Bandendomänen und die G-Bandendomänen in Territorien von Chromosom 15 in menschlichen Zellkernen mit FITC bzw. Cy5 in verschiedenen spektralen Signaturen fluoreszenzmarkiert wurden; konfokale 3D-Aufnahmen wurden registriert und die erhaltenen FITC- bzw. Cy5-Datensätze mit dem o. bechriebenen volumenkonservernden Verfahren [5] evaluiert, wobei experimentell verifizierte Korrekturen der chromatischen Verschiebung vorgenommen wurden [106]. Die Ergebnisse zeigten, dass die R-Banden und die G-Banden auch im Zellkern jeweils individuelle Domänen bilden und sich nur zu einem relativ geringen Grad einander überlagern. Dieses Ergebnis war kompatibel mit dem MLS-Modell, während die Berechnung des Überlappungsvolumens mit Hilfe des Random-Walk-/Giant-Loop-Modells einen wesentlich geringeren Grad an quantitativer Übereinstimmung erbrachte [69].

Ungeachtet der oben angegebenen experimentellen Hinweise für einen weitergehenden Grad von dreidimensionaler Ordnung in den Chromosomenterritorien wurde bei den untersuchten morphologischen und topologischen Parametern dennoch eine erhebliche Variabilität festgestellt.

Inwieweit diese Variabilität eine Folge von unterschiedlichen zellulären Zuständen oder aber von technischen Unzulänglichkeiten bei Markierung,

3D-Bildaufnahme oder 3D-Bildanalyse ist, bedarf weiterer Untersuchung. Selbst wenn sich der bisherige Eindruck erheblicher Variabilität bestätigen sollte, würde dies immer noch mit einem hohen funktionellen Ordnungsgrad vereinbar sein, wie er z.B. in dem oben skizzierten ICD-Modell postuliert wurde. Denkbar wäre z.B. ein Aufbau der Chromosomenterritorien aus einer Reihe von Subdomänen mit einem hohen räumlichen Ordnungsgrad der Subdomänen, die sich jedoch aufgrund von Verbindungselementen aus stärker flexiblen Chromatinfasern gegeneinander verschieben können.

8.3.5 Dynamik der Kernarchitektur

Da die Chromosomenterritorien dreidimensionale Gebilde darstellen, müssen quantitative Untersuchungen zu ihrer Verteilung im Zellkern auf bestimmte Referenzgrößen bezogen werden, wie z.B. den Abstand von markierten Zentromerregionen homologer und nichthomologer Chromosomen voneinander; den Abstand bestimmter Zentromerregionen vom Kernmittelpunkt bzw. von der Kernhülle; den aus Painting-Daten berechneten Abstand von Schwerpunkten von Chromosomenterritorien von einander bzw. vom Kernmittelpunkt oder von der Kernhülle.

In teilungsaktiven menschlichen Zelltypen, wie z.B. Amnionflüssigkeitszellen, Fibroblasten, oder phytohämagglyutinstimulierten Lymphozyten, wurde eine erhebliche Zelle-zu-Zelle Variabilität der räumlichen Verteilung von Zentromerregionen spezifischer Territorien nach *In-situ*-Hybridisierung fixierter Kerne beobachtet. Dabei wurden zunächst konventionelle Verfahren der Lichtmikroskopie [36] oder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie [75] eingesetzt. Mit Hilfe der Anwendung der axialtomographischen Mikroskopie und der Bestimmung der Schwerpunkte der markierten Zentromerregionen durch digitale Bildanalyse gelang es, die dreidimensionalen (euklidischen) Abstände von Zentromerregionen voneinander bzw. vom Kernmittelpunkt erheblich exakter als bislang möglich zu ermitteln [29]. Die mit Hilfe von CLSFM ermittelten Distanzen zwischen den Schwerpunkten der Chromosomenterritorien #7 und #X [35] änderten sich bei Anwendung des Cavalieri-Estimators mit verschiedenen Schwellwerten nur geringfügig, im Mittel um weniger als 100 nm (P. Edelmann et al., unveröff. Resultate).

Andere konfokale Untersuchungen zur Verteilung markierter Zentromerregionen in fixierten menschlichen Zellen zeigten Änderungen in der Verteilung der Chromosomenterritorien als Funktion des Zellzyklus [37, 52].

Kürzlich gelang es, chromosomale Zentromerbereiche auch in *lebenden* menschlichen Zellen durch Fluoreszenzmarkierung zu visualisieren und erste CLSFM-Beobachtungen durchzuführen [88]. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung einer erheblichen Bewegungsdynamik von chromosomalen Abschnitten *in vivo*, die in den untersuchten Interphasezellen in wenigen Minuten zu Ortsveränderungen bis zu etwa 1/10 des Kerndurchmessers führte.

Eine von Zelle zu Zelle und auch innerhalb der Einzelzelle variable räumliche Verteilung von Chromosomenterritorien sollte zahlreiche Kontakte eines

bestimmten Territoriums mit vielen anderen ermöglichen. Dies ist kompatibel [27] mit strahlenbiologischen Resultaten, denen zufolge nach Einwirkung ionisierender Strahlung ein bestimmter Chromosomentyp in verschiedenen Metaphasezellen Austauschereignisse (z.B. Translokationen) mit vielen anderen Chromosomen zeigt.

8.4 Perspektiven

8.4.1 Bedeutung einer dreidimensionalen Kernarchitektur

Die dreidimensionale, insbesondere die konfokale Fluoreszenzmikroskopie und 3D-Bildverarbeitung hat in Verbindung mit molekularbiologischen und immunhistochemischen Markierungsverfahren die Grundlagen gelegt für eine differenzierte, experimentelle Untersuchung der dreidimensionalen Genomstruktur in 3D-konservierten („intakten“) Zellkernen.

Die 3D-Genomarchitektur ist für viele Bereiche der heutigen biomedizinischen Grundlagenforschung von Bedeutung (s. Problemstellung [93]). Über die bereits erwähnte allgemeine Regulation von Transkription, Replikation und Reparatur hinaus könnten Änderungen der Genomarchitektur auch bei der Zelldifferenzierung sowie möglicherweise auch bei einer Reprogrammierung der Genexpression eine Rolle spielen [100]; ferner könnten sie wesentlich sein auch für die beobachtete Reversion von Tumorgewebe unter dem Einfluss der extrazellulären Matrix [98].

Als ein spezielles Beispiel für die mögliche funktionelle Relevanz der Kernarchitektur für eine dreidimensionale Genopathologie soll hier ein strahlenbiologischer Aspekt diskutiert werden.

DNA-schädigende Noxen, insbesondere DSB-erzeugende ionisierende Strahlung, aber auch chemische und enzymatische Einwirkungen können zu der Entstehung von spezifischen, mit Malignität korrelierten Chromosomentranslokationen führen [67]. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die mit chronischer myeloischer Leukämie (Ph^+) korrelierte Fusion der *abl*-/*bcr*-Gene durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 [94]. Nach dem ICD-Modell kann ein solches Translokationsereignis nur dann induziert werden, wenn

1. die entsprechenden Gene zum Zeitpunkt der „illegitime“ Rekombination an der Oberfläche der zugehörigen Territorien lokalisiert sind;
2. die Territorien im Zellkern so in Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind, dass diese Gene in unmittelbare räumliche Nähe zu einander kommen [27].

Wird demnach durch eine geeignete Verteilung dieser Chromosomenterritorien im Kern eine solche räumliche Nähe verhindert oder begünstigt, so sinkt oder steigt dem Modell zufolge die Wahrscheinlichkeit einer malignen Zelltransformation unter sonst gleichen Bedingungen (z.B. Strahlenbelastung, Reparatureffizienz). Diese Wahrscheinlichkeit könnte bereits durch relativ

geringe Änderungen der räumlichen Distanzen zwischen den betreffenden Genen stark beeinflusst werden [32]. Auch bei gegebener räumlicher Distanz könnte die Topologie der beteiligten chromosomalen Regionen die Wahrscheinlichkeit einer *gleichzeitigen* Bindung von DNA-Abschnitten an denselben Reparaturenzymkomplex aus sterischen Gründen beeinflussen.

DNA-Doppelstrangbrüche sind über ihre große tumorbiologische Bedeutung hinaus auch für ein Verständnis normaler zellulärer Prozesse interessant, wie bei der meiotischen Rekombination [39, 103], wobei die Chromatinstruktur die DSB-Bildung und damit die Rekombination beeinflusste.

8.4.2 Weiterentwicklung der konfokalen Mikroskopie

Die dreidimensionale Struktur biologischer Makromoleküle hat sich seit langem als ein entscheidender Zugang für ein tieferes Verständnis ihrer Funktion erwiesen. Dies gilt vermutlich nicht allein für Proteine und Ribonukleinsäuren, sondern auch für die dem Molekulargewicht nach ganz wesentlich größeren Strukturen des Genoms.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sind räumliche Auflösungen von wenigen nm erreichbar. Diese Methode kann auch mit In-situ-Hyridisierungsverfahren kombiniert werden. Grundsätzlich könnte damit die räumliche Lage sogar von einzelnen, kleinen Genabschnitten in Chromosomenterritorien erfasst werden. Die elektronenmikroskopische Methode hat jedoch auch erhebliche Schwierigkeiten. So ist sie außerordentlich arbeitsaufwendig: Ein Zellkern muss geeignet präpariert und in Schichten mit einer Dicke von etwa 100 nm und weniger geschnitten werden; anschließend müssen die Schichten nacheinander in das Elektronenmikroskop eingebracht werden. Nur wenige Kerne können auf diesem Wege untersucht werden. Um zu statistisch abgesicherten quantitativen Ergebnissen zur Chromosomentopologie zu kommen, müssen aber selbst bei Zellen desselben Typs vermutlich viele Chromosomenterritorien getestet werden; die Ermittlung funktionell relevanter Abstandsverteilungen zwischen spezifischen Genorten verschiedener Chromosomenterritorien erfordert die Untersuchung vieler Zellkerne. Hinzu kommt, dass mit den gängigen elektronenmikroskopischen Methoden die Zahl der gleichzeitig spezifisch markierbaren Chromosomenorte gering ist. Für eine genauere Erforschung der räumlichen Struktur von Chromosomenterritorien ist es jedoch von entscheidender Bedeutung, viele Chromosomenorte gleichzeitig spezifisch markieren zu können, wie dies mit Hilfe von Vielfarben-FISH möglich ist [87, 90]. Nur so kann man die relativen Lagen vieler Gene in demselben Territorium zueinander bestimmen und damit seine funktionelle Topologie erkennen.

Ähnliche Probleme treten auch bei anderen ultramikroskopischen Techniken auf wie z.B. der Rasterkraftmikroskopie, oder der optischen Nahfeld-scanningmikroskopie [2]. Für die Untersuchung der Architektur intakter Zellkerne wäre es daher weiterhin außerordentlich wichtig, wenn es lichtmikroskopische Instrumente gäbe (Fernfeldmikroskope), mit denen man relativ

„dicke“ transparente Objekte, wie es Zellkerne mit ihren rund $10\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser sind, mit stark erhöhter räumlicher Auflösung bzw. stark erhöhtem Auflösungsäquivalent untersuchen könnte. Dann brauchte man die Kerne nicht physisch in dünne Schichten zu schneiden; man könnte für die gleichzeitige, spezifische Markierung von Genorten verschiedene spektrale Signaturen verwenden (z.B. eine Kombination von Fluorochromen mit einem verschiedenen Fluoreszenzemissionsspektrum, oder mit einer verschiedenen Fluoreszenzlebensdauer).

Wegen der Wellennatur des Lichts ist zwischen Objekten *gleicher* spektraler Signatur eine höhere 3D-Auflösung als einige hundert nm mit „konventioneller“ Fernfeldepifluoreszenzmikroskopie grundsätzlich nicht erreichbar. Ernst Abbe selbst wies jedoch bereits darauf hin, dass die von ihm beschriebenen Grenzen der Auflösung in der Zukunft durch neuartige Techniken überwunden werden könnten. Normalerweise wird die Erfüllung dieser Vision auf die Entwicklung der Elektronenmikroskopie und anderer Ultrastrukturmikroskopietechniken bezogen. Auf der Basis der neuen Gegebenheiten von Laserlichtquellen, hochpräziser Optoelektronik und leistungsfähiger digitaler Bildverarbeitung wurde es jedoch möglich, fernfeld-lichtoptische bildgebende Systeme zu konzipieren [22, 45, 47, 49, 50] und teilweise bereits in ersten Prototypen zu realisieren [42, 44, 48], die eine erheblich bessere Auflösung im Fernfeld erreichen als mit konventioneller CLSM. Langfristig könnte es möglich werden, im Fernfeld lichtoptisch benachbarte Targets *gleicher* spektraler Signatur zu unterscheiden, die einen Abstand von nur ca. 20–30 nm haben. Dies würde etwa 2 Nukleosomendurchmessern entsprechen, der Basiseinheit der Genomorganisation in Zellkernen.

Haben die im Fernfeld lichtoptisch zu detektierenden Targets nicht die gleiche, sondern *unterschiedliche* spektrale Signatur, so sollte ein vergleichbar gutes oder noch besseres Auflösungsäquivalent auch mit Hilfe der spektralen Hochpräzisionsmikroskopie realisierbar sein. Dabei würde sich die Möglichkeit einer *molekularen Topologie* der untersuchten Chromatinregion ergeben, bei der sogar 3D-Positionen der Schwerpunkte einzelner benachbarter, *spektral unterschiedlich markierter* DNA-Sequenzen von jeweils nur wenigen hundert Basenpaaren Länge (entsprechend der mit einem einzelnen Nukleosom assoziierten DNA) quantitativ vermessen werden könnten. Um die dazu erforderliche 3D-Positionierungsgenauigkeit von nur wenigen Nanometern für die die Position beschreibenden Intensitätsschwerpunkte zu erreichen, müssten hier pro markierter DNA-Sequenz ca. 10^5 Photonen detektiert werden (H. Bornfleth, pers. Mitteilung). Bei hohem Markierungsgrad und ausreichend stabilen Fluorochromen erscheint diese Forderung grundsätzlich realisierbar, z.B. mit Hilfe von Mehrphotonenanregung. Ein weiteres gravierendes Problem bei der Realisierung einer *molekularen Topologie* ausgewählter Genombereiche besteht darin, den unspezifischen Fluoreszenzhintergrund aus dem durch die PSF des Systems gegebenen Beobachtungsvolumen genügend zu diskriminieren; eine ausreichend gute Unterscheidung von Hintergrund und Signal

könnte hier durch Einbeziehung von Fluoreszenzlebensdauermessungen [17] möglich werden.

Ein weiterer Vorteil von Mehrphotonenanregung bzw. Fluoreszenzlebensdauerdetektion bestünde in der dadurch bei Hochpräzisionsdistanzmessungen ermöglichten Eliminierung von Fehlern der chromatischen Aberration: Fluorochrome verschiedener spektraler Signatur (Fluoreszenzemission, Fluoreszenzlebensdauer) können über Mehrphotonenprozesse gleichzeitig angeregt werden unter Verwendung z.B. von Femtosekundenpulsen im Infraroten [38].

Auf dem Wege zu einem molekularen Auflösungsäquivalent erscheint es sinnvoll, die konfokalen Verfahren durch andere Ansätze zu ergänzen wie z.B. die laserstimulierte quantitative Präzisionsdistanzwellenfeldmikroskopie [12, 13]. Bei dieser auf der Grundlage qualitativer Anordnungen [1, 55] entwickelten Messtechnik ist es möglich geworden, die Intensitätsschwerpunkte der 3D-Positionen von fluoreszenzmarkierten Targets im Fernfeld mit einer Präzision von ca. 2,5 nm lateral und ca. 1 nm axial zu vermessen [86].

Beide Verfahren, die Mikroskopie hoher *Auflösung* und die Mikroskopie hohen *Auflösungsäquivalents*, haben in der Genomforschung sich ergänzende Anwendungsbereiche. Zur Erläuterung soll ein konkretes (vorerst noch hypothetisches) Beispiel dienen:

Untersucht werden soll die funktionelle 3D-Struktur einer Chromatin-domäne von insgesamt einigen 100 kbp. Bei *homogener* Markierung der Region (z.B. mit überspannenden YAC-Klonen) wäre eine Strukturanalyse mit Hilfe der etablierten CLSM-Methoden nicht möglich, da die typischen Abmessungen der gesamten Region im Bereich der konfokalen 3D-Auflösung liegen (A. Esa, H. Bornfleth, L. Trakhtenbrot et al., unveröff. Resultate). Eine wesentliche Verbesserung der 3D-Auflösung durch „Point Spread Function Engineering“, z.B. mit Hilfe von konfokaler 2-Photonen-4π-Mikroskopie [42, 51], würde bereits erlauben, die räumliche Anordnung von Gruppen von Nukleosomen in der ca. 10^3 Nukleosomen umfassenden Chromatindomäne zu analysieren. Mit Hilfe von Verfahren der spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie könnten dann innerhalb der Gesamtstruktur die Positionen der Intensitätsschwerpunkte ganz bestimmter markierter DNA-Teilsequenzen mit *molekularer* Präzision vermessen und ihre topologischen Beziehungen innerhalb der Chromatindomäne bestimmt werden, wobei die Einbeziehung der quantitativen „Standing-Wave-Field“-Mikroskopie hilfreich sein sollte. Hier besonders interessierende Teilsequenzen wären beispielsweise die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, oder von Nichthistionstrukturproteinen. Als zellbiologisch oder auch genopathologisch relevantes Ergebnis würde sich z.B. eine 3D-Strukturaussage über die Zugänglichkeit einer Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor ergeben.

Eine für die 3D-Genopathologie relevante *praktische* Anwendung von Verfahren mit verbessertem Distanzauflösungsäquivalent wäre z.B. eine verbesserte Diskriminierung von realer Translokation und „optischer Fusion“ von tumorrelevanten DNA-Sequenzen (z.B. abl-bcr [94]).

8.4.3 Verbesserung von Markierungsmethoden

Die bislang bei Untersuchungen zur Kernarchitektur angewandten In-situ-Hybridisierungsverfahren enthalten verschiedene Prozeduren, welche die in der lebenden Zelle bestehende Kernarchitektur in bestimmter Weise verändern [83]. Dazu gehören insbesondere das gewählte Fixierungsverfahren; die Entfernung von Kernproteinen durch Proteaseverdau zur besseren Probenpenetration; hohe Konzentrationen von denaturierenden chemischen Agentien wie Formamid zur Verbesserung der „Stringenz“, d.h. der Bindungsspezifität der DNA-Proben; die zur Denaturierung der chromosomal Target-DNA verwendeten erhöhten Temperaturen von ca. 70°C und darüber; „Stringenz“waschungen nach der In-situ-Hybridisierung mit hohen Formamidkonzentrationen bzw. bei hohen Temperaturen.

Untersuchungen der Morphologie von Kernen menschlicher Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Verfahrensschritten der In-situ-Hybridisierung, beginnend mit Zellen vor der Fixierung, ergaben nur geringe *visuelle* Änderungen von Länge, Breite und Höhe des Zellkerns sowie der Position von Nukleolen. In anderen Experimenten wurden in fixierten Kernen die Zentromere mit kinetochorspezifischen Antikörpern markiert. Anschließend wurde eine Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung mit einer alle Zentromeren markierenden repetitiven DNA-Probe durchgeführt, unter Einschluss eines Verdaus mit Proteasen. Die fluoreszenzmikroskopische *Beobachtung* zeigte eine identische Verteilung der beiden Markierungsmuster [26].

Diese und andere Beobachtungen [83] sprechen dafür, dass die Kernarchitektur bei den verwandten FISH-Prozeduren im Rahmen der normalen lichtmikroskopischen Auflösung weitgehend erhalten bleibt. Dies schließt jedoch Änderungen auf kleinerer Skala nicht aus. Möglicherweise können jedoch bereits kleine Positionsveränderungen von großer funktioneller Bedeutung sein (wie z.B. im Rahmen des ICD-Modells). Solche Strukturdetails könnten mit Hilfe weiterentwickelter Fernfeldmikroskopiemethoden untersucht werden. Eines der wesentlichen methodischen Ziele besteht daher in der Weiterentwicklung von spezifischen In-vivo-Markierungsverfahren. Über eine In-vivo-Markierung spezieller DNA-Abschnitte mit Hilfe von DNA-bindenden fluoreszierenden oder fluoreszenzmarkierten Proteinen [15,83,88] hinaus wäre die Entwicklung von multispektralen In-vivo- (oder zumindest die Mikrostruktur erhaltenden *Vital-*)Markierungstechniken für beliebige DNA-Sequenzen wünschenswert; dieses Ziel könnte durch eine Optimierung von FISH-Verfahren [30,40,41] hin zu möglichst „physiologischen“ Bedingungen erreicht werden, z.B. mit Hilfe von Dreifachstrangbildungen [31,99].

8.4.4 Weiterentwicklung von Computermodellen

Der Nutzen der konfokalen Mikroskopie (und anderer 3D-Mikroskopiemethoden) für Strukturfunktionsuntersuchungen in der Genomforschung hängt wesentlich von einer die verbesserten Messmöglichkeiten berücksichtigenden

Weiterentwicklung von Computermodellen der Genomarchitektur ab, die in zunehmender Weise auch die physikalischen, chemischen, biochemischen, molekularbiologischen und biologischen „Randbedingungen“ einbezieht („Theoretische Biophysik des Zellkerns“).

Ein menschliches Chromosom mittlerer Größe besitzt (inklusive Proteine) mehrere Milliarden Atome und ca. 150 Mio. Basenpaare. Eine atomare Struktursimulation eines gesamten Chromosomenterritoriums oder gar eines Zellkerns auf dieser Ebene und unter Einbeziehung der o.g. Randbedingungen wäre derzeit vermutlich ein aussichtloses Unternehmen.

Ein Weg zur Lösung besteht darin, bei möglichst einfachen geometrischen Modellen zu beginnen [27, 68] und dann zu immer komplexeren Modellen fortzuschreiten. Dies kann auf verschiedenen Ebenen geschehen. Zum Beispiel kann man bei ganzen Domänen oder sogar Territorien als „Element“ beginnen. Bei der Struktursimulation der Domänen selbst kann man z.B. einfache geordnete Elemente wie eine 30 nm Faser annehmen oder auch von einem „Zig-Zag“-Modell des Chromatins [102] ausgehen. Je nach Annahmen über die Wechselwirkungskräfte und Randbedingungen können dabei Strukturen mit höchst unterschiedlichen Ordnungsgraden simuliert werden. Eine Übertragung der formalen Grundprinzipien der Bildung von 3D-Proteinstrukturen aus der Faltung zunächst linearer Polyaminosäureketten [78, 95] würde z.B. die Möglichkeit ergeben, dass auch die nach der Replikation zunächst linearen DNA-Doppelstränge sich spontan zu höchst komplexen 3D-Strukturen von funktioneller Bedeutung falten könnten. Derzeit erscheint es nicht mehr ausgeschlossen, dass auch die DNA die für eine derartige Übertragung erforderlichen Wechselwirkungsmechanismen besitzt: außer den *abstoßenden* elektrostatischen Kräften der Phosphatgruppen sind auch sequenzspezifische *anziehende* Wechselwirkungen denkbar, z.B. über die Bildung tripelhelikaler Abschnitte [99]; die für die Strukturbildung von Proteinen wichtige Disulfidbrückenfunktion könnte bei DNA durch DNA-sequenzspezifische „Linker“-Proteine gegeben sein.

Wie oben angedeutet, kann die Weiterentwicklung von Computermodellen für sich selbst ein äußerst reichhaltiges Spektrum von Chromatinmodellen generieren; offensichtlich wird eine sinnvolle Modellbildung nur in ständigem Vergleich mit quantitativen Strukturmessungen am tatsächlich existierenden Chromatin möglich sein.

Die Integration von theoretischer Modellbildung und experimentellen quantitativen Verfahren in einer Biophysik des Zellkerns lässt ein wesentlich vertieftes Verständnis der funktionellen Organisation des Genoms erwarten; daraus ergibt sich auch eine unmittelbare Relevanz für eine dreidimensionale *Genopathologie*.

Verfahren der konfokalen Mikroskopie und andere Methoden der hochauflösenden dreidimensionalen Bildgewinnung können hier weitere wichtige Beiträge leisten.

Danksagung

Über die im Text zitierten Literaturhinweise hinaus bin ich zahlreichen Kolleginnen und Kollegen und Mitarbeitern zu Dank verpflichtet für vielfältige Diskussionen sowie Einsicht in noch unveröffentlichte Ergebnisse. Insbesondere gilt mein Dank Dipl.-Phys. H. Bornfleth, Dr. J. Bradl, Dr. S. Dietzel, Prof. R. Dörries, Dr. M. Durm, Dipl.-Phys. P. Edelmann, Dr. R. Eils, Prof. F. Eckhart-Schupp, Dipl.-Phys. A. Esa, Prof. R. Fink, Prof. U. Hagen, PD Dr. M. Hausmann, Dipl.-Phys. R. Heintzmann; PD Dr. S. Hell, Prof. K. Holmes, Prof. S. Inoue, Prof. W. Jäger, Dr. A. Jauch, Dipl.-Phys. I. Kirsten, Dipl.-Phys. H. Koester, Prof. J. Langowski, PD Dr. P. Lichter, Dr. S. Lindek, Dipl.-Phys. H. Münch, Dr. C. Münkel, Prof. A.T. Natarajan, Prof. G. Obe, Dipl.-Phys. B. Rinke, Prof. B. Sakmann, Dipl.-Phys. V. Sauermann, Dr. E. Stelzer, Dr. L. Trakhtenbrot, Dr. D. Zink.

Die vieljährige Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und die jahrzehntelange Zusammenarbeit mit Prof. T. Cremer war die unverzichtbare Grundlage der hier zusammengefassten Untersuchungen.

Literatur

1. Bailey B, Farkas DL, Taylor DL, Lanni F (1993) Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing wave excitation. *Nature* 366:44–48
2. Betzig E, Trautmann JK (1992) Near-field optics: microscopy, spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit, *Science* 257:189–195
3. Bischoff A, Albers J, Kharboush I, Stelzer EHK, Cremer T, Cremer C (1993) Differences of size and shape of active and inactive X-chromosome domains in human amniotic fluid cell nuclei. *Microscopy Research and Technique* 25:68–77
4. Blobel G (1985) Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(8):827–8529
5. Bornfleth H, Sätzler K, Eils R, Cremer C (1997) High precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. Submitted.
6. Bornfleth H, Sätzler K, Zink D, Eils R, Cremer C (1997) Model-based segmentation of biological structures in three-dimensional confocal microscopic images using a four-dimensional approach. *Cell Vision* 4:203–204
7. Bradl J, Hausmann M, Ehemann V, Komitowski D (1992) A tilting device for three-dimensional microscopy: application to *in situ* imaging of interphase cell nuclei. *J Microsc* 168:47–57
8. Bradl J, Hausmann M, Schneider B, Rinke B, Cremer C (1994) A versatile 2 p-tilting device for fluorescence microscopes. *J Microsc* 176:211–221
9. Bradl J, Schneider B, Rinke B, Stelzer EHK, Durm M, Hausmann M, Cremer C (1995) A versatile 2 p-tilting device for conventional light and confocal laser scanning microscopy. *Zool Stud* 34(Suppl 1):178–179
10. Bradl J, Rinke B, Schneider B, Edelmann P, Krieger H, Hausmann M, Cremer C (1996) Resolution improvement in 3-D microscopy by object tilting. *Microscopy and Analysis* Nov 1996:9–11

11. Bradl J, Rinke B, Esa A, Edelmann P, Krieger H, Schneider B, Hausmann M, Cremer C (1996) Comparative study of three-dimensional localization accuracy in conventional, confocal laser scanning and axial tomographic fluorescence light microscopy. *Proc SPIE* vol 2926:201–206
12. Bradl J, Schneider B, Kirsten I, Hausmann M, Cremer C (1997) Quantitative precision distance measurements of single targets in interphase nuclei by wave field microscopy. *Scanning* 19:158
13. Bradl J, Nagorni M, Schneider B, Hausmann M, Cremer C (1997) Microscope control, image acquisition and visualization in a network environment: Towards „online“ telemicroscopy. *Cell Vision* 4:241–242
14. Brakenhoff GJ, van der Voort HTM, van Spronsen EA, Linnemanns WAM, Nanninga N (1985) Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* 317:748–749
15. Buchenau P, Saumweber H, Arndt-Jovin DJ (1997) The dynamic nuclear redistribution of an hn K-homologous protein during *Drosophila* embryo development and heat shock. Flexibility of transcription sites in vivo. *J Cell Biol* 137:291–303
16. Carlsson K, Aslund N (1987) Confocal imaging for 3-D digital microscopy. *Appl Optics* 26:3232–3238
17. Carlsson K, Liljeborg A (1997) Confocal fluorescence microscopy using spectral and lifetime information to simultaneously record four fluorophores with high channel separation. *J Microsc* 185:37–46
18. Chai LS, Sandberg AA (1988) Chromosomes and their relationship to nuclear components during the cell cycle in Chinese hamster cells. *Cell Tissue Research* 251:197–204
19. Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB (1996) XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence of a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol* 132:259–275
20. Cox IJ, Sheppard CJR, Wilson T (1982) Super-resolution by confocal fluorescent microscopy. *Optik* 60:391–396
21. Cremer C, Zorn C, Cremer T (1974) An ultraviolet lasermicrobeam for 257 nm. *Microscopica Acta* 75:331–337
22. Cremer C, Cremer T (1978) Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microscopica Acta* 81:31–44
23. Cremer C, Münnkel C, Granzow M, Jauch A, Dietzel S, Eils R, Guan X-Y, Meltzer PS, Trent JM, Langowski J, Cremer T (1996) Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Res* 366:97–116
24. Cremer T, Baumann H, Nakanishi K, Cremer C (1984) Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-uv-microbeam experiments. *Chromosomes Today* 8:203–212
25. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome-specific library probes. *Human Genetics* 80:235–246
26. Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schröck E, Speicher MR, Mathieu U, Jauch A, Emmerich P, Scherthan H, Ried T, Cremer C, Lichter P (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 58:777–792

27. Cremer T, Dietzel S, Eils R, Lichter P and Cremer C (1995) Chromosome territories, nuclear matrix filaments and interchromatin channels: a topological view on nuclear architecture and function. In: Brandham PE and Bennett MD (eds) Kew Chromosome Conference IV:63–81
28. Cremer T, Popp S, Emmerich P, Lichter P, Cremer C (1990) Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression *in situ* hybridization. *Cytometry* 11:110–118
29. Dietzel S, Weilandt E, Eils R, Müncel C, Cremer C and Cremer T (1995) Three-dimensional distribution of centromeric or paracentromeric heterochromatin of chromosomes 1, 7, 15 and 17 in human lymphocyte nuclei studied with light microscopic axial tomography. *Bioimaging* 3:121–133
30. Durm M, Hausmann M, Aldinger K, Ludwig H and Cremer C (1996) Painting of human chromosome 8 in fifteen minutes. *Z Naturf* 51c:435–439
31. Durm M, Haar F-M, Hausmann M, Ludwig H, Cremer C (1997) Non-enzymatic, low temperature fluorescence *in situ* hybridization of human chromosomes with a repetitive a-satellite probe. *Z Naturf (J Biosciences)* 52c:82–88
32. Edwards AA, Moiseenko VV and Nikjoos H (1994) Modelling of DNA breaks and the formation of chromosome aberrations. *Int J Radiat Biol* 66:633–637
33. Eils R, Bertin E, Saracoglu K, Rinke B, Schröck E, Parazza F, Unch Y, Robert-Nicoud M, Stelzer EHK, Chassery JM, Cremer T and Cremer C (1995) Application of confocal laser microscopy and three-dimensional Voronoi diagrams for volume and surface estimates of interphase chromosomes. *J Microsc* 177:150–161
34. Eils R, Saracoglu K, Müncel C, Imhoff J, Sätzler K, Bertin E, Dietzel S, Schröck E, Ried T, Cremer T and Cremer C (1995b) Three-dimensional imaging approaches and Monte Carlo simulations: development of tools to study the morphology and distribution of chromosome territories and subchromosomal targets in human cell nuclei. *Zool Studies (Taiwan)* 34(Suppl 1):7–10
35. Eils R, Dietzel S, Bertin E, Schröck E, Speicher MR, Ried T, Robert-Nicoud, M, Cremer C, Cremer T (1996) Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes; active and inactive X-chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 135:1427–1440
36. Emmerich P, Loos P, Jauch A, Hopman AHN, Weigant J, Higgins M, White BN, Van Der Ploeg, M, Cremer C, Cremer T (1989) Double *in situ* hybridization in combination with digitized image analysis: A new approach to study interphase chromosome topography. *Experimental Cell Res* 181:126–140
37. Ferguson M, Ward DC (1992) Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 101:557–565
38. Fischer A, Cremer C, Stelzer EHK (1995) Fluorescence of coumarines and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium-sapphire laser. *Appl Optics* 34:1989–2003
39. Goldway M, Sherman A, Zenvirth D, Arbel T, Simchen G (1993) A short chromosomal region with major roles in yeast chromosome III meiotic disjunction, recombination and double strand breaks. *Genetics* 133:159–169
40. Haar F-M, Durm M, Aldinger K, Celeda D, Hausmann M, Ludwig H, Cremer C (1994) A rapid FISH technique for quantitative microscopy. *Biotechniques* 17:346–353

41. Haar F-M, Durm M, Hausmann M, Ludwig H, Cremer C (1996) Optimization of fast-FISH for a-satellite DNA probes. *J Biochem Biophys Methods* 33:43–53
42. Hänninen PE, Hell SW, Salo J, Soini E, Cremer C (1995) Two-photon excitation 4π confocal microscope: enhanced axial resolution microscope for biological research. *Appl Phys Lett* 66:1698–1700
43. Heintzmann R, Münch H, Cremer C (1997) High-precision distance measurements in epifluorescent microscopy – simulation and experiment. *Cell Vision* 4:252–253
44. Hell S, Stelzer EHK (1992) Fundamental improvement of resolution by a 4π -confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Optics Comm* 93:277–282
45. Hell S, Stelzer EHK (1992) Properties of a 4π confocal fluorescence microscope. *Opt Soc Am A* 9:2159–2166
46. Hell S, Reiner G, Cremer C, Stelzer EHK (1993) Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatch in refractive index. *J Microsc* 169:391–405
47. Hell S, Wichmann J (1994a) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Lett* 19:780–782
48. Hell S, Lindek S, Cremer C, Stelzer EHK (1994) Measurement of the 4π -confocal point spread function proves 75 nm axial resolution. *Appl Phys Lett* 64:1335–1337
49. Hell S (1994) Improvement of lateral resolution in far-field fluorescence light microscopy by using two-photon excitation with offset beams. *Optics Comm* 106:19–24
50. Hell S, Krug M (1995) Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl Phys B* 60:495–497
51. Hell S, Schrader M, Hänninen P, Soini E (1995) Resolving fluorescence beads at 100–200 nm axial distance with a two-photon 4π -microscope operating in the near infrared. *Optics Commun* 120:129–133
52. Hulspas R, Houtsmuller AB, Kritjenburg P-J, Baumann JGJ, Nanninga N (1994) The nuclear position of pericentromeric DNA of chromosome 11 appears to be random in G0 and non-random in G1 human lymphocytes. *Chromosoma* 103:286–292
53. Krauss SW, Larabell CA, Lockett S, Gascard P, Penman S, Mohandas N, Chasis JA (1997) Structural protein 4.1 in the nucleus of human cells: dynamic rearrangements during cell division. *J Cell Biol* 137:275–289
54. Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel R, Cremer T, Lichter P (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol* 135:1195–1205
55. Lanni F, Bailey B, Farkas DL, Taylor DL (1993) Excitation field synthesis as a means for obtaining enhanced axial resolution in fluorescence microscopes. *Bioimaging* 1:187–196
56. Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC (1991) Analysis of genes and chromosomes by non-isotopic *in situ* hybridization. *Genet Anal Techn Appl* 8:24–35
57. Lichter P, Cremer T (1992) Chromosomes analysis by non-isotopic *in situ* hybridization. In: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds) *Human Cytogenetics – A Practical Approach*, vol F (2nd edn. IRL Press, Oxford) pp. 157–192

58. Lindek S, Salmon N, Cremer C, Stelzer EHK (1994) Theta microscopy allows phase regulation in 4 Pi(A)-confocal two-photon fluorescence microscopy. *Optik* 98:15–20
59. Lohs-Schardin M, Sander K, Cremer C, Cremer T, Zorn C (1979) Localized ultraviolet laser microbeam irradiation of early *Drosophila* embryos: fate maps based on location and frequency of adult effects. *Develop Biol* 68:533–545
60. Lohs-Schardin M, Cremer C, Nüsslein-Volhard C (1979) A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*: localized cuticle effects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam. *Develop Biol* 73:239–255
61. Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* 169:375–382
62. Manders EMM, Hoebe R, Strackee J, Vossepoel AM, Aten JA (1996) Largest contour segmentation: a tool for the localization of spots in confocal images. *Cytometry* 23:15–21
63. Manuelidis L (1990) A view of interphase chromosomes. *Science* 250:1533–1540
64. Masters BR (Ed.) (1996) Selected papers on confocal microscopy. SPIE Milestone Series Volume MS 131. SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Washington
65. Meltzer PS, Guan X-Y, Burgess A and Trent J (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics* 1:24–28
66. Minski M (1957) Microscopy Apparatus. US Patent # 3013467
67. Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genetics* 15:417–474
68. Müncel C, Eils R, Imhoff J, Dietzel S, Cremer T, Cremer C (1995) Simulation of the distribution of chromosome targets in cell nuclei under geometrical constraints. *Bioimaging* 3:108–120
69. Müncel C, Eils R, Zink D, Dietzel S, Cremer T, Langowski J (1997) A multi-loop subcompartment model for the organization of interphase chromosomes. Submitted
70. Nüsslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, Cremer C (1980) A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature* 283:474–476
71. Paro R (1995) Propagating memory of transcriptional states. *Trends in Genetics* 11:295–297
72. Paro R, Harte PJ (1996) The role of polycomb group and trithorax group chromatin complexes in the maintenance of determined cell states. In: *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*, Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 507–528
73. Pawley JB (1995) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York
74. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray JW (1988) Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9138–9142
75. Popp S, Scholl HP, Loos P, Jauch A, Stelzer EHK, Cremer C, Cremer T (1990) Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Exper Cell Res* 189:1–12
76. Razin SV and Gromova II (1995) The channels model of nuclear matrix structure. *Bio Essays* 17:443–450

77. Razin SV, Gromova II and Iarovaia OV (1995) Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *Int Rev of Cytol* 162B:405–448
78. Ring CS, Cohen MA (1993) Modeling protein structures-construction and their applications. *FASEB J* 7:783–790
79. Rinke B, Bischoff A, Meffert MC, Scharschmidt R, Hausmann M, Stelzer EHK, Cremer T and Cremer C (1995) Volume ratios of painted chromosome territories 5, 7 and X in female human cell nuclei studied with confocal laser microscopy and the Cavalieri estimator. *Bioimaging* 3:1–11
80. Rinke B, Bradl J, Schneider B, Durm M, Hausmann M, Ludwig H, Cremer C (1996) „*In situ*“ estimates of the spatial resolution for „practical“ fluorescence microscopy of cell nuclei. In: Slavik J (ed) *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*. Plenum Press, New York, pp. 169–173
81. Rinke B, Bradl J, Edelmann P, Schneider B, Hausmann M, Cremer C (1996) Image acquisition and calibration methods in quantitative confocal laser scanning microscopy. *Proc SPIE Vol* 2926:190–200
82. Rinke B (1997) Axialtomographische Mikroskopie zur hochauflösenden Analyse der Interphase-Genomorganisation. Dissertation, Fakultät für Physik der Universität Heidelberg
83. Robinett CC, Straight A, Li G, Willhelm C, Sudlow G, Murray A, Belmont AS (1996) *In vivo* localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol* 135:1685–1700
84. Sachs RK, van den Engh G, Trask BJ, Yokota H and Hearst JE (1995) A random-walk/giant loop model for interphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2710–2714
85. Savage JRK, Papworth DG (1973) The relationship of radiation-induced dicentric yield to chromosome arm number. *Mutat Res* 19:139–143
86. Schneider B, Bradl J, Kirsten I, Hausmann M, Cremer C (1997) High precision localization of fluorescent targets in the nanometer range by spatially modulated excitation fluorescence microscopy. In: Slavik J (ed) *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*. Vol. 2. Plenum Press, New York, pp. 63–68
87. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494–497
88. Shelby RD, Hahn KM, Sullivan KF (1996) Dynamic elastic behaviour of a satellite DNA domains visualized *in situ* in living human cells. *J Cell Biol* 135:545–557
89. Spector DL (1990) Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:147–151
90. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12:368–375
91. Stelzer EHK, Marsman HJB, Wijnendaal van Resandt RW (1986) A setup for a confocal scanning laser interference microscope. *Optik* 73:30–33
92. Stelzer EHK, Lindek S (1994) Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Opt Commun* 111:536–547
93. Stroboulis J, Wolffe A (1996) Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 109:1991–2000

94. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andruff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayanan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D (1990) Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous Leukemia by *in situ* hybridization. *Science* 250:559–562
95. Unger R, Moult J (1993) Genetic algorithms for protein folding simulations. *J Mol Biol* 231:75–81
96. Van den Engh GJ, Sachs RK, Trask BJ (1992) Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model. *Science* 257:1410–1412
97. Vogt P (1990) Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved „chromatin folding code“. *Hum Genet* 84:301–306
98. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ (1997) Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137:231–245
99. Wells RD, Collier DA, Harvey JC, Shimizu M, Wohlrab F (1988) The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine: oligopyrimidine sequences. *FASEB J* 2:2939–2949
100. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–813
101. Wijnnaendts van Resandt RW, Marsman HJB, Kaplan R, Davoust J, Stelzer EHK, Stricker R (1985) Optical fluorescence microscopy in three dimensions: microtomoscopy. *J Microsc* 138:29–34
102. Woodcock CLF, Grigoryev SA, Horowitz RA, Whitaker N (1993) A chromatin folding model that incorporates linker variability and generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9021–9025
103. Wu T-C, Lichten M (1994) Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* 263:515–518
104. Yokota H, Van Den Engh G, Hearst JE, Sachs RK, Trask BJ (1995) Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus. *J Cell Biol* 130:1239–1249
105. Zachar Z, Kramer J, Morris IP, Bingham PM (1993) Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J Cell Biol* 121:729–742
106. Zink D, Bornfleth H, Visser A, Cremer C, Cremer T (1997) Interphase chromosome banding: Approaching the functional organization of human chromosome territories. Submitted
107. Zirbel RM, Mathieu U, Kurz A, Cremer T, Lichter P (1993) Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res* 1:92–106
108. Zorn C, Cremer C, Cremer T, Zimmer J (1979) Unscheduled DNA synthesis after partial uv irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res* 124:111–119

9 Hochauflösende 3D-Lichtmikroskopie

S.W. Hell

9.1 Grundlegendes zur Auflösung

Kaum ein anderes wissenschaftliches Instrument ist so eng mit der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung verknüpft wie das Mikroskop. Seit seiner Erfindung durch den Niederländer Leeuwenhook im 17. Jahrhundert hat sich das Mikroskop als unentbehrliches Werkzeug zur Erforschung von Struktur und Funktion lebender Organismen erwiesen, vielmehr noch, es ist zu einem Markenzeichen der biomedizinischen Forschung geworden.

Am Anfang der Entwicklung stand das Lichtmikroskop, das infolge zügiger Fortschritte in der Optik bereits im letzten Jahrhundert mit guten Leistungsdaten aufwarten konnte. Dem stetig wachsenden technischen Fortschritt folgten biologisch-medizinische Erkenntnisse auf den Fuß. Als Beispiel seien die Arbeiten des Jenaer Physikers Ernst Abbe im ausgehenden 19. Jahrhundert hervorzuheben. Abbe gelang es nicht nur, eine elegante Theorie der mikroskopischen Abbildung zu entwerfen, er konnte durch verfeinerte Berechnungen die bis dahin störenden chromatischen und sphärischen Aberrationen der Objektive reduzieren und die Auflösung des Lichtmikroskops an eine Grenze heranführen, die bis heute seinen Namen trägt. Diese Verbesserung verhalf u.a. zur erstmaligen Beobachtung des Verhaltens der Chromosomen während der Zellteilung.

Heutzutage ist die Lichtmikroskopie stark diversifiziert. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren und Kontrastmechanismen wie z.B. Fluoreszenz-, Reflexions-, Phasenkontrast- und Interferenzkontrastmikroskopie mit charakteristischen Vorteilen und Anwendungen. Die in der biologisch-medizinischen Forschung am meisten verbreitete Art der Mikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie. Die zu beobachtenden Organellen und Strukturen werden direkt oder indirekt mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, der aufgrund seiner charakteristischen Fluoreszenzemission Informationen über Lage und Funktion der markierten Zellbausteine liefert. Die Verbreitung dieses Verfahrens ist im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass Fluoreszenz spezifischer ist als Absorption oder Reflexion von Licht: man kann die interessierenden Bereiche und Strukturen gut erkennen, weil sie sich gut vom Rest der Probe abheben. Diesen Vorteil verdankt die Fluoreszenzmikroskopie nicht zuletzt der Fluoreszenzfarbstoffchemie, die mittlerweile eine Vielzahl von Farbstoffen mit unterschiedlichen Spektren und Eigenschaften anbietet. Wir wollen uns hier ausschließlich mit Fluoreszenzmikroskopie beschäftigen.

Was bedeutet nun Auflösung und was hat es mit der Abbe-Auflösungsgrenze auf sich? Die Auflösung ist zweifelsohne die wichtigste Eigenschaft eines Mikroskops, weil sie die feinste Struktur bestimmt, die man in einem Mikroskop als solche erkennen kann. Dabei liegt die Betonung auf Struktur, d.h. im einfachsten Fall sind es zwei feine, gleichartige, punkt- oder linieneinförmige, eng benachbarte Objekte. Die Struktur gilt als aufgelöst, wenn man sie im Bild getrennt wahrnehmen kann. Als Beispiel könnte man zwei Genabschnitte nehmen, die 200 nm voneinander entfernt sind. In der Tat ist ca. 200 nm in etwa der kleinste Abstand, bei dem man zwei gleichartige Objekte, z.B. zwei fluoreszierende Moleküle oder Molekülanhäufungen in einem Standardfluoreszenzlichtmikroskop als getrennte Objekte wahrnehmen kann.

Woran liegt das? Der eigentliche Prozess, der bei der Abbildung stattfindet, lässt sich zumindest für die Fluoreszenzmikroskopie einfach formulieren. Nehmen wir an, wir hätten ein selbstleuchtendes Objekt. Laut geometrischer Optik wäre die Rolle der Linse oder des abbildenden Linsensystems zwei beliebig gewählte, benachbarte, leuchtende Objektpunkte in zwei benachbarte Bildpunkte zu verwandeln. Die Bildpunkte sollen einen größeren Abstand besitzen, um ihn dem Auge zugänglich zu machen. Die fundamentale Erkenntnis Abbes war nun, dass die beiden Bildpunkte nicht – wie von der geometrischen Optik vorhergesagt – von jeweils einem einzigen Objektpunkt stammen können, sondern von einem Objektbereich, dessen Ausdehnung durch das Beugungsmuster des Lichts an der Öffnung des Objektivs bestimmt ist. Ein gutes Maß für diesen Bereich ist der Radius des Hauptmaximums des Beugungsmusters, Δr , der sich aus

$$\Delta r = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha} \quad (9.1)$$

ergibt. Der Parameter n ist dabei der Brechungsindex der Probe, λ ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts und α ist der halbe Öffnungswinkel des Objektivs. Das Produkt $n \sin \alpha = NA$ wird als numerische Apertur bezeichnet. Setzt man übliche Werte wie $\lambda = 550 \text{ nm}$ und $NA = 1,3$ ein, so erhält man $\Delta r \approx 260 \text{ nm}$. D.h., Objektpunkte die näher als Δr sind, lassen sich bei dieser Wellenlänge nicht klar voneinander trennen. Damit ist das Auflösungsproblem als Beugungsproblem definiert, das sich durch eine Verkleinerung der Wellenlänge verbessern, aber nicht lösen ließe. Die Verkleinerung von Δr durch kürzere Wellenlängen und etwas größere Aperturen ist zwar denkbar, aber es gibt technische Hürden, die numerische Aperturen über 1,4 und Wellenlängen unter 350 nm verhindern. Man muss deshalb von einer Grenze von $\Delta r \approx 180 \text{ nm}$ im Standardfluoreszenzmikroskop ausgehen. (Das Modell des Selbstleuchters ist auf die Fluoreszenz übertragbar, weil die Phase des anregenden Lichts verlorengeht und die Farbstoffmoleküle in guter Näherung als Selbstleuchter betrachtet werden können.)

Es soll hier am Rande bemerkt werden, dass Auflösung mit der Kleinheit der Objekte, die im Mikroskop sichtbar sind, wenig zu tun hat. So ist es ohne weiteres möglich, einzelne Fluoreszenzmoleküle von der Größe von ein

paar Nanometer in einem Lichtmikroskop zu sehen, d.h. als solche zu erkennen. Voraussetzung ist nur ein sehr lichtempfindlicher Detektor und dass die Moleküle nicht näher als Δr beieinander sind, sodass ihre Beugungsmuster sich im Bild nicht überlappen. Dazu muss die Konzentration der Moleküle nur niedrig genug sein. Es ist heutzutage gängige Praxis, sehr dünne Lösungen oder räumliche Verteilungen von Fluoreszenzfarbstoffen im Mikroskop zu betrachten. Damit lässt sich das Anregungs-, Abkling-, Fluoreszenz- und Bleichverhalten einzelner Moleküle beobachten und genau studieren.

Abbes Einsicht, die Auflösung als Beugungsphänomen zu identifizieren, und die Erkenntnis, dass man technisch an einer Grenze angelangt sei, führte in diesem Jahrhundert zur Entwicklung radikal neuer Methoden wie der Elektronen- und Rastersondenmikroskopie. Diese Verfahren ermöglichen Auflösungen bis in den atomaren Bereich. Bei der Elektronenmikroskopie nutzt man die Tatsache, dass man aufgrund der De-Broglie-Beziehung schnellen Elektronen kurze Wellenlängen (0,1 nm und kürzer) zuordnen kann. Beugung spielt in der praktischen Elektronenmikroskopie im Regelfall keine limitierende Rolle.

Eine optische Variante des Rastersondenmikroskops ist das Nahfeldmikroskop, mit dem man in der Tat Auflösungen besser als Δr erzielen kann. Wie geht das? Es gibt mehrere Realisierungsmöglichkeiten. Es läuft aber immer darauf hinaus, die Beugung zu umgehen, indem man die Wechselwirkung des Lichts mit der Probe mit Hilfe einer spitzen Sonde auf einen Bereich mit Abmessungen $< \Delta r$ reduziert. Als Beispiel lässt sich eine lichtleitende Glasfaser spitze mit einer Öffnung von 80 nm angeben. Bringt man diese Spitz mit einem Abstand unter einer Wellenlänge λ an die Probenoberfläche heran, um diese zu beleuchten oder um von ihr Licht aufzusammeln, so ist die Auflösung im Wesentlichen durch die Öffnung der Glasfaser bestimmt. Damit lassen sich Auflösungen, die deutlich besser als Δr sind, erreichen. Alternativ lassen sich Spitzen auch als Störsonden eines großflächig eingestrahlten Feldes benutzen – wichtig dabei ist, dass man sich immer in unmittelbarer Nähe ($\ll \lambda$) der zu untersuchenden Probe befindet – daher der Name *Nahfeldmikroskopie*. Lichtmikroskope mit fokussierender Optik heißen seither *Fernfeldmikroskope*.

Trotz ihrer zunächst begrenzten Auflösung ist die Attraktivität der Fernfeldlichtmikroskopie ungebrochen. Dafür gibt es einen einfachen Grund. Fokussiertes Licht ist zwar durch Beugung gekennzeichnet, kann aber in das Innere transparenter Proben eindringen, ohne dass eine destruktive Probenpräparation erforderlich wäre. Nahfeldmikroskope sind als Kontaktverfahren auf Oberflächen angewiesen. In der biologischen Forschung spielt sich ein Großteil der Phänomene aber eher im Innern der Zelle ab. Die Elektronenmikroskopie ist an sich auch ein zweidimensionales Oberflächenverfahren, weil die Elektronen an der Oberfläche absorbiert werden und die Erstellung eines dreidimensionalen Bildes ein feines Zerschneiden der Probe erfordert. Die Beobachtung lebender Zellen ist ebenfalls nicht möglich, sodass die Elektronenmikroskopie oder die optische Nahfeldmikroskopie die Fernfeldmikroskopie

nicht ersetzen kann. Fernfeldmikroskope mit höherer Auflösung wären daher von erheblicher praktischer Bedeutung. Die Beugung stellt allerdings eine erhebliche Herausforderung dar.

9.2 Die Punktabbildungsfunktion als dreidimensionale Sonde

Würde man versuchen, die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops zu erhöhen, so ginge das zwar auch, aber man hätte eine eher ungünstige Ausgangsposition. Eine bessere Ausgangsposition hat man, wenn man das Objekt mit einem oder mehreren Strahlen abrastert. Und am einfachsten ist es, wenn das Objekt mit einem fokussierten Strahl Punkt für Punkt abgerastert wird und die seriell gespeicherten Intensitätswerte anschließend in einem Bild dargestellt werden. Die zur Zeit leistungsfähigsten Fluoreszenzrastermikroskope sind das konfokale und das Multiphotonenrastermikroskop. Beide sind Fernfeldverfahren. Während das konfokale Mikroskop bereits einen Stammplatz in der biologischen Mikroskopie erobert hat, ist das Multiphotonenmikroskop erst dabei, sich einen solchen zu erobern.

9.2.1 Das konfokale Fluoreszenzrastermikroskop

Das konfokale Fluoreszenzrastermikroskop beleuchtet nicht uniform, sondern verwendet eine Punktlichtquelle. Man bevorzugt Laser, weil sie aufgrund ihrer hohen Strahldichte genügend Licht zur Verfügung stellen können, um die Farbstoffe effizient anzuregen. Das vom Objekt emittierte Licht wird üblicherweise von demselben Objektiv registriert und auf einen punktförmigen Detektor fokussiert, der sich optisch konjugiert zur Punktlichtquelle befindet. Die Punktlichtquelle realisiert man, indem man eine kleine Lochblende beleuchtet und diese in das Objekt abbildet. Der Punktdetektor wird zumeist mit Hilfe einer Lochblende, die sich unmittelbar vor dem Detektor befindet, realisiert. Punktlichtquelle, Objektpunkt und Punktdetektor sind zueinander optisch konjugiert (Abb. 9.1).

Der Clou dieser Anordnung ist, dass aufgrund der Punktförmigkeit der Lichtquelle und des Detektors ein *effektiver Fokus* entsteht, der sich genau besehen wie eine „*Sonde*“ verhält. Um im konfokalen Mikroskop ein Bild zu erhalten, muss man die Probe durch „*die Sonde*“ in allen Raumrichtungen durchrastern und den Intensitätswert registrieren. Auf diese Weise lässt sich ein dreidimensionales Bild eines transparenten Objekts erstellen.

Die Eigenschaft des konfokalen effektiven Fokus als dreidimensionale, räumlich begrenzte Sonde kann man physikalisch auf anschauliche Weise verstehen; das quantitative Verständnis erfordert ein paar Grundlagen der Beugungstheorie. Die von der punktförmigen Lichtquelle ausgehende Wellenfront wird vom Objektiv teilweise gesammelt und von diesem idealerweise in ein Kugelwellenfrontsegment umgewandelt, das laut geometrischer Optik auf

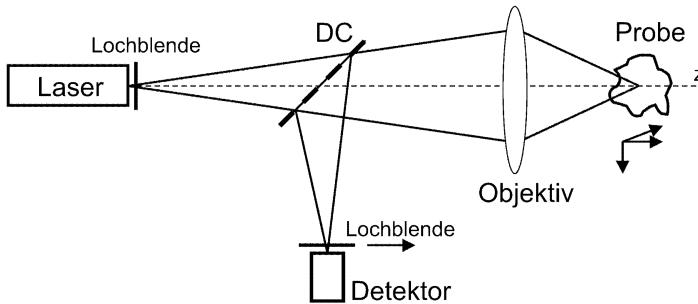


Abb. 9.1. Anordnung eines konfokalen Fluoreszenzrastermikroskops bestehend aus Laser, Lochblenden, Farbteiler (DC) und Objektiv. Bei Multphotonenanregung wird in der Regel die Lochblende vor dem Detektor entfernt

dem geometrischen Bildpunkt der Punktlichtquelle konvergieren würde. Aufgrund der Beugung erhält man aber eine dreidimensionale Intensitätsverteilung mit dem geometrischen Fokus als Zentrum, die sich aus den Parametern Wellenlänge und Apertur, d.h. Öffnungswinkel der konvergierenden Wellenfront berechnet. In guter Näherung ergibt sich die fokale Intensitätsverteilung aus

$$I(u, v) = C \left| \tilde{h}(u, v) \right|^2 = C h(u, v) = C' \left| \int_0^1 J_0(v\rho) \exp\left(\frac{1}{2}i u \rho^2\right) \rho d\rho \right|^2. \quad (9.2)$$

Die Variablen u und v sind optische Koordinaten, die mit den Ortskoordinaten, x, y, z über die Beziehung

$$u = 8\pi n z \sin^2(\alpha/2)/\lambda \quad \text{bzw.} \quad v = 2\pi n r \sin(\alpha)/\lambda$$

definiert sind. J_0 ist die Bessel-Funktion nullter Ordnung. Ferner gilt $r = \sqrt{x^2 + y^2}$. C ist eine Normierungskonstante, um die Funktion $h(u, v)$ dimensionslos und auf Eins zu normieren. Die Funktion $\tilde{h}(u, v)$ ist proportional zur elektrischen Feldstärke im Fokus. Da wir hier von Beleuchtung gesprochen haben, können wir $h(u, v)$ als Beleuchtungspunktabbildungsfunktion (engl. *illumination point-spread-function*, I-PSF) des Objektivs bezeichnen und mit einem Index $h_{\text{ill}}(u, v)$ versehen. Die optischen Koordinaten u und v werden häufig statt der realen Ortskoordinaten verwendet, weil sie die (offensichtliche) Abhängigkeit der PSF von der Wellenlänge und der Apertur herausnormieren und so eine universellere Beschreibung der PSF erlauben.

Die numerische Berechnung der Beleuchtungs-PSF ergibt eine zylindersymmetrische Intensitätsverteilung um den geometrischen Fokus. Diese ist in Abb. 9.2a für den Spezialfall der numerischen Apertur von 1,35 (Öl) und $\lambda = 488 \text{ nm}$ berechnet und in Ortskoordinaten dargestellt. Das Intensitätsmaximum befindet sich im geometrischen Fokus und nimmt nach außen hin ab. In der Fokalebene ($z, u = 0$) ist die fokale Intensitätsverteilung durch $h(0, v)$ gegeben (Abb. 9.3a). Man erkennt ein Hauptmaximum und ein erstes

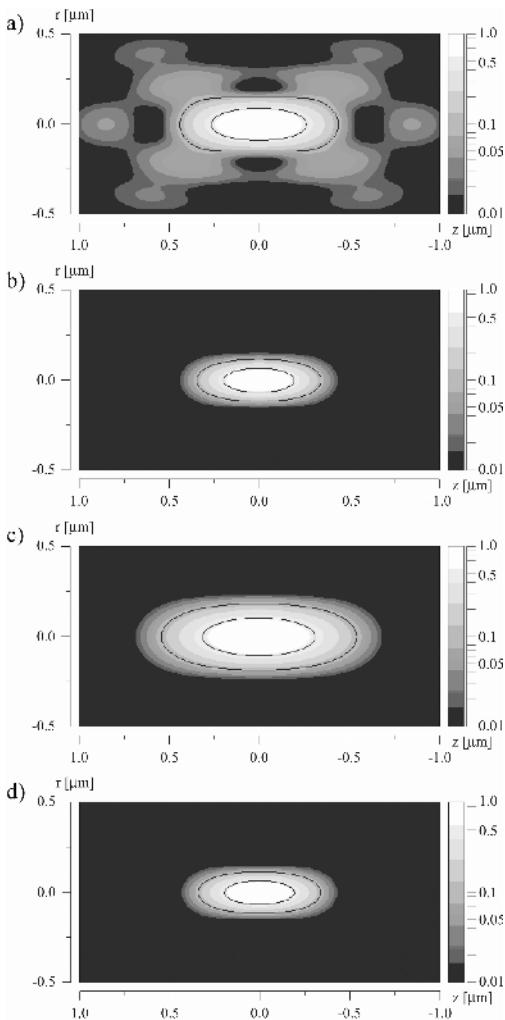


Abb. 9.2. Punktabbildungsfunktionen (PSF) eines Ölimmersion-objektivs der numerischen Apertur von 1,35 in einem Schnitt entlang der optischen Achse: (a) Intensitätsverteilung im Fokus h_{int} bei $\lambda = 488 \text{ nm}$; (b) dazugehörige effektive konfokale PSF h_{conf} , für $\lambda_{\text{det}} = 530 \text{ nm}$; (c) effektive PSF des Zweiphotonenmikroskops h_{int}^2 bei $\lambda = 800 \text{ nm}$, (d) dazugehörige konfokale effektive PSF $h_{\text{int}}^2 h_{\text{det}}$ bei einer Fluoreszenzwellenlänge von 450 nm

Minimum, das sich in optischen Einheiten bei $v = 1,22\pi$ befindet. Aus der Definition von v ergibt sich unmittelbar (9.1): Mit anderen Worten, die Lage des ersten Minimums der fokalen Intensitätsverteilung ist ein Maß für die Auflösung in der Fokalebene. Das Hauptmaximum wird oft als Airy-Scheibe bezeichnet und ist ein Maß für die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops.

Interessant ist auch das Verhalten des Beugungshauptmaximums entlang der optischen Achse (z). Es fällt auf, dass die fokale Intensitätsverteilung axial ausgedehnt ist; bei einer numerischen Apertur von 1,35 (Ölimmersion) ist der Fokus ca. 3,5-mal länger als breit. Es sei nur der Vollständigkeit halber erwähnt, dass sich das erste Minimum entlang der optischen Achse bei $\alpha < 50^\circ$ bei $u \approx \pm 4\pi$ befindet, bei Aperturwinkeln $\alpha > 50^\circ$ rücken die Mini-

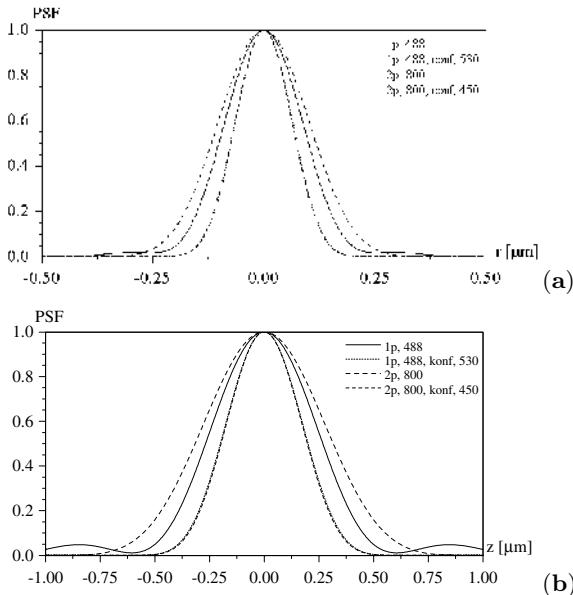


Abb. 9.3. (a) Axiale und (b) laterale Profile der in Abb. 9.2 gezeigten effektiven Punktabbildungsfunktionen

ma merklich näher an den geometrischen Fokuspunkt. Betrachtet man die Definition von u , so stellt man fest, dass die axiale Länge des Hauptmaximums umgekehrt proportional zu $\sin^2(\alpha)$ ist. Die Ausdehnung des Maximums in axialer Richtung nimmt mit fallender Apertur quadratisch zu.

In der Fluoreszenzmikroskopie hat die dreidimensionale fokale Intensitätsverteilung eine sehr anschauliche Bedeutung. Sie ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Anregungsphoton am Punkt (u, v) ankommt und ein Fluoreszenzmolekül anregt. Damit ist sie auch ein Maß für die räumliche Verteilung der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Fluoreszenzphoton von einem Punkt (u, v) emittiert wird. Im *konfokalen* Mikroskop muss allerdings das Fluoreszenzphoton in den Punkt detektor gelangen, um zum Bild beitragen zu können. Dieser Prozess ist ebenfalls durch eine räumliche Detektions-Wahrscheinlichkeits-Verteilung bestimmt; es ist nämlich wahrscheinlicher, dass ein Fluoreszenzphoton in den Punkt detektor gelangt, wenn es in unmittelbarer Nähe des geometrischen Fokuspunkts emittiert wird. Aufgrund der Symmetrie der Anordnung ist die Detektions-Wahrscheinlichkeits-Verteilung durch eine fast gleiche fokale Intensitätsverteilung, $h_{\text{det}}(\epsilon u, \epsilon v)$ gegeben, die sich nur durch den Faktor $\epsilon = \lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{fl}}$ unterscheidet, welcher der etwas längeren Fluoreszenzwellenlänge Rechnung trägt. Typischerweise ist $\epsilon \approx 0,95$, sodass man in erster Näherung sogar $\epsilon = 1$ setzen kann. Damit jetzt ein Punkt im Fokalbereich zum Signal im Detektor beiträgt, müssen sowohl Anregung bei (u, v) , als Detektion von (u, v) erfolgen. Daraus ergibt sich, dass die Abbildung eines konfokalen Mikroskops effektiv durch das Quadrat der

Punktabbildungsfunktion gegeben ist

$$h_{\text{conf}}(u, v) = h_{\text{ill}}(u, v)h_{\text{det}}(u, v) \cong h^2(u, v). \quad (9.3)$$

Sie wird als konfokale Punktabbildungsfunktion (C-PSF) bezeichnet (Abb. 9.2b). Sie ist die effektive Punktabbildungsfunktion des konfokalen Mikroskops.

Das Quadrieren hat zwei Konsequenzen. Zum einen ist die C-PSF schmäler; man bekommt eine um den Faktor 1,4 bessere Auflösung, wenn man die Halbwertsbreite des Hauptmaximums als Maßstab nimmt. Zum zweiten werden Koordinatenpunkte, die sich weit weg vom Fokus befinden, in ihrem Beitrag unterdrückt. Deshalb wirkt der Fokus eines konfokalen Mikroskops wie eine Sonde, welche die Fluoreszenzmoleküle, die sich im Innenbereich des Fokus befinden, besser registriert als die außen. Sie erfasst einen Intensitätswert, der proportional zur Zahl der in (u, v) vorhandenen Farbstoffmoleküle ist und wichtet gemäß dem Faktor $h_{\text{conf}}(u, v)$.

Hier muss insbesondere die axiale Diskriminierung hervorgehoben werden. Rastert man beispielsweise eine unendliche dünne Ebene in axialer Richtung, so bleibt der in einem großflächigen Detektor gemessene Intensitätswert gleich, in einem konfokal arrangierten Punkt detektor misst man allerdings nur dann ein merkliches Signal, wenn die Ebene das Hauptmaximum passiert.

Was geschieht eigentlich mit der Phase des anregenden Lichts? Im Gegensatz zur Reflektionsmikroskopie geht die Phase des anregenden Lichts bei der Absorption im Farbstoffmolekül verloren. Die Fluoreszenzmikroskopie ist damit eine inkohärente Form der Abbildung. Das bedeutet, dass sich das Bild $b(u, v)$ des fluoreszierenden Objekts aus der dreidimensionalen Faltung der räumlichen Verteilung der Fluoreszenzmoleküle $t(u, v)$ und der effektiven PSF $h(u, v)$ ergibt. Die PSF ist also eine „Apparatefunktion“, die im Fernfeldmikroskop durch Beugung aber auch durch die optische Anordnung des Mikroskops bestimmt ist.

Technisch wird die Faltung durch das dreidimensionale Rastern bewerkstelligt. Will man in die Tiefe einer Probe eindringen, so setzt das natürlich voraus, dass die Proben transparent sind. Für die meisten Zellen ist das der Fall, sodass sich die konfokale Rastermikroskopie zum 3D-Mikroskopieverfahren schlechthin entwickelt hat. Gemäß dem Signalabtasttheorem (Nyquist-Kriterium) wählt man als Raster eine Punktmatrix, die ca. 2- bis 3-mal feiner ist als die Auflösungsgrenze. Das bedeutet für hohe Aperturen (wie 1,2-1,4 Ölimmersion) in lateraler Richtung etwa $0,2\Delta r \approx 50-100$ nm und in axialer Richtung ca. 80-200 nm.

Es gibt drei Möglichkeiten zu rastern. Im einfachsten Fall befindet sich die Probe auf einem positionierbarem Verschiebetisch, der eine Feinpositionierung in drei Dimensionen erlaubt. Eine schnellere und daher viel gängigere Methode ist die Bewegung des Strahls über die Probe hinweg. Bei den meisten kommerziell erhältlichen konfokalen Rastermikroskopen wird der Strahl in lateraler Richtung (x, y) gerastert, während die axiale Positionierung mit

Hilfe eines Feintranslators wie z.B. einem Piezoelement durchgeführt wird. Eine dritte Möglichkeit ist das Rastern mittels einer rotierenden Lochscheibe. Die Löcher stellen die (konfokalen) Beleuchtungs- und Detektionslochblenden dar; man hat dadurch mehrere konfokale Mikroskope quasi parallel geschaltet. Der Detektor ist in diesem Fall eine CCD-Kamera. Die Löcher sind so angeordnet, dass durch das schnelle Rotieren der Scheibe die Fokalebene ein paar Mal die Sekunde überstrichen und das Objekt gemäß dem Nyquist-Kriterium erfasst wird. Als konfokale Rastermikroskope ist allen gemein, dass sie das Objekt mit Hilfe eines effektiven Fokus rastern, der seine Eigenschaft als Sonde einer quadratischen Abhängigkeit verdankt.

9.2.2 Das Multiphotonenfluoreszenzrastermikroskop

Seit Anfang der 90er Jahre gibt es eine weitere, elegante Methode, eine quadratische effektive PSF und damit 3D-Mikroskopie zu realisieren, nämlich die Zweiphotonenanregung. Hier nutzt man die 1931 von Maria Göppert-Mayer vorhergesagte und 1963 von Kaiser und Garrett verifizierte Tatsache, dass man Atome oder Moleküle auch durch die simultane Absorption *zweier* Photonen der *halben* Anregungsenergie, also doppelter Wellenlänge, in den angeregten Zustand überführen kann. Der Farbstoff Rhodamine 6G, den man üblicherweise im Einphotonenmodus bei einer Wellenlänge von 530 nm anregt, lässt sich z.B. im Zweiphotonenmodus bei 1060 nm anregen. In Abb. 9.4 sind verschiedene Anregungsmodi schematisch dargestellt.

In der Zweiphotonenmikroskopie verwendet man wieder einen Laser und rastert das Objekt mit dem fokussierten Strahl ab. Die fokale Beleuchtungintensität ist wieder durch h_{ill} beschrieben. Die Absorptionswahrscheinlichkeit

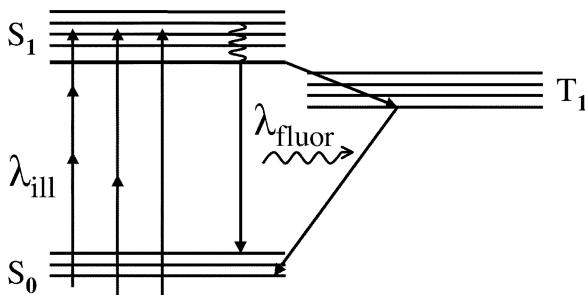


Abb. 9.4. Energietermschema (Jablonski-Diagramm) eines organischen Farbstoffs. S_0 bezeichnet den elektronischen Grundzustand, S_1 den ersten angeregten Zustand. Die Zustände sind in Vibrationsniveaus aufgespalten, von denen bei Raumtemperatur zumeist die untersten besetzt sind. Anregungen durch 1-, 2- und 3-Photonenabsorptionsprozesse sind eingezeichnet. Dem Wechsel des elektronischen Zustands folgt zunächst innerhalb einer Pikosekunde eine thermische Relaxation. T_1 bezeichnet den (metastabilen) Tripletzustand

und damit die erzeugte Fluoreszenz hängt aber quadratisch von der Anregungsintensität ab. Damit ergibt sich die effektive Punktabbildungsfunktion eines Zweiphotonenmikroskops zu

$$h_{2\text{-phot}} = h_{\text{ill}}^2 \left(\frac{u}{2}, \frac{v}{2} \right). \quad (9.4)$$

Die halbierten optischen Koordinaten sind auf die doppelte Anregungswellenlänge zurückzuführen. Für die quadratische Abhängigkeit gibt es auch eine anschauliche Erklärung; da jetzt zwei Photonen gleichzeitig am selben Ort (u, v) ankommen müssen und für jedes die Einzelwahrscheinlichkeit h_{ill} gilt, ist die Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses proportional zum Produkt $h_{\text{ill}}h_{\text{ill}}$. Damit ist klar, dass man in der Zweiphotonenmikroskopie keinen Punktdetektor braucht, um 3D-Auflösung zu erzielen; das Quadrieren, der „konfokale Effekt“, ist durch die Zweiphotonenabsorption an sich gegeben.

In der Praxis bedeutet das, dass man die Punktlochblende vor dem Detektor entfernen und alles von der Probe emittierte Licht sammeln kann. Im Gegensatz zum konfokalen Mikroskop, wo auf die symmetrische Rückabbildung des Fluoreszenzlichts auf den Punkt detektor geachtet werden muss, ist dies beim Zweiphotonenmikroskop überflüssig. Das Objektiv fungiert nur als Kondensor, sodass sich die Laserrastermikroskopie enorm vereinfacht.

Es gibt aber eine Reihe weiterer Vorteile, die noch stärker zu Buche schlagen. Zum einen lassen sich aufgrund der doppelten Wellenlänge Farbstoffe anregen, die sonst nur im ultravioletten Bereich anzuregen sind. Die Notwendigkeit, teure und spezielle UV-Optiken zu benutzen, fällt ebenfalls weg. Da man im roten bis infraroten Bereich anregt (600–1100 nm) und das Fluoreszenzlicht nur gesammelt wird, kann man UV-Mikroskopie mit konventioneller Optik betreiben. Dazu kommt, dass gängige Objektive im infraroten Wellenlängenbereich relativ gut optimiert und transparent sind.

Ebenso wichtig ist, dass die Anregung nur im Bereich der Fokalebene erfolgt, denn die quadratische Abhängigkeit lässt nur dort eine hohe Anregungswahrscheinlichkeit zu. Die axiale Diskriminierung erfolgt aufgrund der Beleuchtung und nicht aufgrund der Unterdrückung des Fluoreszenzlichts durch eine Lochblende vor dem Detektor. Man kann also davon ausgehen, dass der Farbstoff der Probe insgesamt weniger durch Anregungen belastet wird, deren Fluoreszenz von der Lochblende ohnehin herausgefiltert werden würde. Dadurch kann das Bleichen des Farbstoffs in dickeren Proben insgesamt deutlich vermindert werden.

Ein weiterer Vorteil ist, dass man mit Hilfe der Zweiphotonenmikroskopie tiefer in stark streuende Proben eindringen kann – z.B. in Nervengewebe und Gehirndünnschnitte. Doppelte Wellenlänge bedeutet auch deutlich reduzierte Streuung des anregenden Lichts in der Probe. Streuung an Objekten, die deutlich kleiner sind als λ , wird als Rayleigh-Streuung beschrieben und nimmt proportional mit $\propto \lambda^{-4}$ zu. Sind die Objekte im Bereich λ und etwas kleiner, so spricht man in der Regel von Mie-Streuung, und die Wellenlängenabhängigkeit ist etwas geringer (λ^{-3}). Auf jeden Fall kann man bei einer

Verdoppelung der Wellenlänge mit einer Abnahme der Streuung um einen Faktor 8–16 rechnen.

Um die Streuung des Fluoreszenzlichts, das aufgrund der kürzeren Wellenlänge deutlich mehr gestreut wird, braucht man sich nicht zu sorgen, weil das Fluoreszenzlicht nicht in den Detektor abgebildet werden muss. Es genügt bloßes Detektieren, da aufgrund der nichtlinearen Anregung die 3D-Lokalisation bereits durch die Anregung erfolgt. Mehrfachstreuungen im Objekt machen wenig aus, solange das Fluoreszenzlicht den Weg in den offen stehenden Detektor findet. Ein überzeugender Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie für die biologisch medizinische Forschung liegt also in der hohen Eindringtiefe in stark streuendes Gewebe.

9.2.3 Anregung durch Ein- und Multiphotonenabsorption

Die Frage, die sich jetzt stellt, ist die nach der Gesamtwahrscheinlichkeit des Zweiphotonenabsorptionsprozesses, insbesondere im Vergleich zur Einphotonenabsorption. Abbildung 9.4 zeigt das Energiediagramm eines organischen Moleküls (Jablonski-Diagramm), nämlich den Grundzustand (S_0) und den ersten elektronischen angeregten Zustand (S_1). Diese Zustände sind wiederum in verschiedene Schwingungsunterniveaus aufgefächert. Bei Raumtemperatur sind die höheren Schwingungszustände kaum besetzt, sodass man sich den Anregungsprozess vereinfacht so vorstellen kann: Die Anregung erfolgt aus dem Grundzustand – durch die Absorption eines Photons, oder durch die simultane Absorption zweier oder dreier Photonen der halben oder gedreifachten Energie. Bei den letzteren soll es sich um einen nichtresonanten Übergang handeln, d.h. die Multiphotonenabsorption soll nicht über einen energetisch metastabilen Zwischenzustand des Moleküls erfolgen sondern tatsächlich direkt in den angeregten Zustand. Eingezeichnet ist auch der relativ langlebige Tripletzustand, zu dem der Übergang aufgrund der Auswahlregeln verboten ist.

Es ist interessant festzuhalten, dass das Spektrum der Fluoreszenz von der Art der Anregung unabhängig ist. Dies lässt sich folgendermaßen verstehen. Gemäß dem Franck-Condon Prinzip erfolgt die Anregung vom S_0 nach S_1 in einen höheren Schwingungszustand des S_1 , bei dem sich die schweren Atomkerne gegenüber ihrer räumlichen Anordnung im Grundzustand kaum umorientieren brauchen. Bei Raumtemperatur zerfällt das angeregte Molekül aus diesem energetisch etwas höheren Schwingungszustand in den niedrigsten Schwingungszustand des S_1 , und zwar innerhalb einer Pikosekunde. Die Energie wird in Wärme umgewandelt. Von dort zerfällt das Molekül innerhalb einer Lebensdauer von $\tau \approx 0,5\text{--}5\text{ ns}$ in einen höheren Schwingungszustand des S_0 – idealerweise unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons. Die Zerfallsrate von S_1 ergibt sich aus dem Kehrwert der Lebensdauer: $1/\tau \approx 2\text{--}20 \times 10^8\text{ s}^{-1}$. Der höhere Schwingungszustand des S_0 zerfällt wiederum thermisch in einen seiner untersten Schwingungszustände innerhalb einer Pikosekunde. Die Zerfallsprozesse sind unabhängig davon, ob

die Anregung in den S_1 mittels Ein-, Zwei- oder Dreiphotonenabsorption stattfand. Es sei aber kurz bemerkt, dass man in einem Ensemble von angeregten Fluoreszenzmolekülen sehr wohl die Art der Anregung feststellen kann, und zwar anhand der Polarisation des Fluoreszenzlichts. Die Rückkehr in den Grundzustand kann auch unter Abgabe von Wärme erfolgen, sodass nur ein Bruchteil η der angeregten Moleküle ein Fluoreszenzphoton aussendet. Die Zahl $0 \leq \eta \leq 1$ wird als Quantenausbeute bezeichnet, die bei sehr guten Farbstoffen bei $\eta \approx 0,8\text{--}0,9$ liegt, meistens jedoch zwischen bei $0,1\text{--}0,3$.

Die Rate mit der ein Molekül im Grundzustand in einem Einphotonenprozess ein Photon absorbiert, ist gegeben durch

$$k_1 = \frac{\sigma_1 I}{\hbar\omega}, \quad (9.5)$$

wobei σ_1 den Wirkungsquerschnitt der Einphotonenabsorption bezeichnet, I die Intensität und $\hbar\omega$ die Energie des Photons. Der gängige Farbstoff Rhodamine B besitzt ein Absorptionsmaximum bei 500 nm, sodass $\hbar\omega \approx 4 \times 10^{-19} \text{ Ws}$ gilt. Bei dieser Wellenlänge hat Rhodamin B einen Wirkungsquerschnitt $\sigma_1 = 1,3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$. Er lässt sich aus dem linearen Absorptionskoeffizienten des Moleküls experimentell bestimmen (Lambert-Beer-Gesetz). Der räumliche Verlauf der Intensität $I \equiv h_{\text{int}}(u, v)$ berechnet sich direkt aus (9.2), wobei die Konstante die entsprechenden Absolutwerte und Einheiten besitzen muss. Die Absorptionsrate ist damit $k_1 \equiv k_1(u, v)$.

Das genaue Verhalten des Farbstoffs unter Lichteinstrahlung bestimmt man mit Hilfe von linearen Differentialgleichungen, die das Zwischenpiel von Absorption, thermischer Relaxation und Fluoreszenzemission wiedergeben. Wir wollen hier der Kürze halber darauf verzichten, aber auf eines seiner wichtigsten Vorhersagen – auf die Sättigung – kurz eingehen. Gleichung (9.5) gilt nämlich nur solange sich das Molekül mit hoher Wahrscheinlichkeit im Grundzustand S_0 befindet und absorptionsfähig bleibt. Unmittelbar nach der Absorption ist es für die Dauer τ der Anregung entzogen. Dies setzt der Anregbarkeit und daher der Zahl der Fluoreszenzemissionen pro Sekunde und Molekül eine obere Grenze. Die maximale, mittlere Emissionsrate, mit der ein Molekül emittiert, ist zwangsläufig $1/\tau$. Sie wird erreicht, wenn die Intensität so stark ist, dass das Molekül sofort nach der Rückkehr nach S_0 wieder in den S_1 gepumpt wird. Das Molekül ist damit gesättigt.

Das Erreichen der Sättigung hängt vom Wirkungsquerschnitt und der Lebensdauer des Farbstoffs ab. Um ein praktisches Maß zu haben, definiert man einen Schwellenwert, den man als Sättigungsintensität I^{sat} bezeichnet. Bei der Intensität I^{sat} halten sich definitionsgemäß Absorptions- und spontane Zerfallsrate die Waage. Aus (9.5) folgt dann für die Sättigungsintensität $I^{\text{sat}} = \hbar\omega/(\sigma\tau)$. Das Molekül befindet sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit im Grund- und im angeregten Zustand, und die Emissionsrate des Moleküls beträgt dort $1/(2\tau)$. Für Rhodamin B gilt $\tau = 3 \times 10^{-9} \text{ s}$ und damit $k_1^{\text{sat}} = 1,6 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Für die Sättigungsintensität gilt 10^6 Wcm^{-2} . In der Mikroskopie muss Sättigung vermieden werden, weil die Fluoreszenz-

emission sonst nicht mehr proportional zur Beleuchtungs-PSF $h_{\text{ill}}(u, v)$ ist. Weil $h_{\text{ill}}(u, v)$ bei $(0, 0)$ ein Maximum besitzt, wird Sättigung zuerst im geometrischen Fokuspunkt einsetzen und bei gesteigerter Intensität zu einer disproportionalen räumlichen Ausweitung der Anregung führen. Dies ist gleichbedeutend mit einer Verschlechterung der Auflösung und der axialen konfokalen Diskriminierung.

Die fokale Intensität ist zwar die entscheidende Größe, aber für den Praktiker ist die durch das Objektiv passierende Durchschnittsleistung \bar{P} von größerer Bedeutung, weil sie direkt messbar ist. Mit Hilfe von (9.1) lässt sich die Fläche des fokalen Hauptmaximums als $\pi \left(\frac{\Delta r}{2}\right)^2$ abschätzen, was in etwa der Fläche innerhalb der Halbwertsbreite des Hauptmaximums entspricht.

$$I \approx \frac{4\bar{P}}{\pi \Delta r^2} \approx 3,4\bar{P} \left(n \sin \frac{\alpha}{\lambda}\right)^2. \quad (9.6)$$

Aufgelöst nach der Durchschnittsleistung \bar{P} erhält man unter der Annahme, dass die halbe Sättigungsintensität eine Obergrenze darstellt,

$$\bar{P} \leq \frac{0,15\hbar\omega\lambda^2}{\sigma\tau n^2 \sin^2 \alpha}. \quad (9.7)$$

Verwendet man ein hochauflösendes Ölimmersionsobjektiv der Apertur $(n \sin \alpha) = 1,35$, so berechnet man für Rhodamin B eine zulässige Durchschnittsleistung von $\bar{P} \leq 0,25 \text{ mW}$. Bei höheren Durchschnittsleistungen lassen sich keine brauchbaren Signalsteigerungen mehr erzielen. Des Weiteren muss man bedenken, dass ein Molekül im Durchschnitt nur etwa 5000- bis 10 000-mal fluoreszieren kann, bevor es einen irreversiblen Zerstörungsprozess erleidet. Die bisher angestellten Betrachtungen gelten alle für ein Molekül; natürlich hängt das Signal auch von der Konzentration der Moleküle im Objekt ab. Als Richtwert kann man angeben, dass sich im (abgeschätzten) Fokalvolumen eines hochaperturigen Objektivs ($\pi \times 200^2 \times 600 \mu\text{m}^3$) bis zu 1000 Fluoreszenzmoleküle befinden können; oft aber um 1–2 Größenordnungen weniger.

Regt man das Molekül im Zweiphotonenmodus an, so gilt für die Absorptionsrate

$$k_2 = \frac{\sigma_2 I^2}{(\hbar\omega)^2}, \quad (9.8)$$

wobei σ_2 den Zweiphotonenwirkungsquerschnitt bezeichnet und in $\text{cm}^4 \text{ s}$ gemessen wird. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit des Anregungsprozesses von der Intensität und der ungewöhnlichen Einheit verliert der Wirkungsquerschnitt die anschauliche Bedeutung, die er in der Einphotonenabsorption hat. Dennoch lässt er sich mit Hilfe einer – quantenmechanisch nicht ganz korrekten – Überlegung veranschaulichen. Um gleichzeitig am Ort des Moleküls zu sein, dürfen die absorbierten Photonen nicht mehr als $\lambda/4$ voneinander entfernt sein. Licht legt diese Strecke in der Zeit $\theta =$

$\lambda/(4c) = \pi/(2\omega) \approx 0.8 \text{ fs}$ zurück. Innerhalb dieser Zeit kann das Molekül quasi nicht zwischen einem und zwei Photonen unterscheiden. Man kann sich den Zweiphotonenprozess als Abfolge zweier EinzelphotonenabsorPTIONEN vorstellen, wobei das erste Photon das Molekül in einen „virtuellen“ Zwischenzustand der Lebensdauer θ anhebt. Die Komplettierung der Absorption erfolgt dann durch das zweite Photon. Aus dieser Überlegung kann man ein Gefühl für die Rate der Zweiphotonenabsorption k_2 bekommen, die sich demnach aus dem Produkt von Einphotonenraten und der Lebensdauer des virtuellen Zustands abschätzen lässt: $(\sigma_1 I/(\hbar\omega))^2\theta = I^2(\sigma_1/\hbar\omega^{3/2})^2\pi/2$. Vergleicht man mit (9.8), so findet man die quadratische Abhängigkeit von der Intensität wieder, wie auch eine Abschätzung für $\sigma_2 \approx (\sigma_1)^2\pi/(2\omega) = (\sigma_1)^2\lambda/(4c)$. Setzt man beispielsweise die Werte für Rhodamin B ein, so erhält man mit $\lambda \approx 900 \text{ nm}$, $\sigma_1 \approx 10^{-16} \text{ cm}^2$ einen Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von $\sigma_2 \approx 7.5 \times 10^{-48} \text{ cm}^4 \text{ s}$. Dies ist in der Tat ein vernünftiger Richtwert. Spektroskopische Messungen von Rhodamine B gelöst in Methanol ergeben in diesem Wellenlängenbereich $\sigma_2 \approx 7-20 \times 10^{-49} \text{ cm}^4 \text{ s}$. Tabelle 9.1 fasst ein paar Wirkungsquerschnitte gängiger Farbstoffe zusammen.

Die Notwendigkeit, zwei Photonen gleichzeitig zu absorbieren, weist darauf hin, dass für die Zweiphotonenabsorption hohe Intensitäten vorteilhaft oder erforderlich sind. Mit Hilfe von (9.8) lässt es sich leicht verifizieren, dass bei den in der Einzelphotonenmikroskopie üblichen Intensitäten von unter 10^6 W cm^{-2} und den dazugehörigen Leistungen von unter 1 mW kaum nennenswerte Zweiphotonenabsorptionen erfolgen; aus (9.8) errechnet sich $k_2 \approx 12.5 \text{ s}^{-1}$ für $\sigma_2 = 20 \times 10^{-49} \text{ cm}^4 \text{ s}$, also gerade mal ein paar pro Sekunde. Um lebende fluoreszenzmarkierte Zellen schnell genug aufnehmen zu können, hat man in der Laserrastermikroskopie typische Ortsverweildauern (engl. pixel dwell time) von $1-10 \mu\text{s}$. Selbst bei einer Konzentration von ca. $100 \text{ Fluoreszenzmolekülen pro Ortspunkt}$ wäre das Signal nicht ausreichend. Damit ist klar, dass Zweiphotonenmikroskopie von vornherein höhere Beleuchtungintensitäten erfordert.

Tabelle 9.1. η ist die Quantenausbeute. Zu σ_2 : relativer Fehler von 30%, alle Messungen bei der Wellenlänge von 700 nm ; zu σ_3 : relativer Fehler von Faktor 3, alle Messungen bei 1000 nm . (Daten nach [5])

	$\sigma_1 \times 10^{-16}$ [cm^2]	$\eta \times \sigma_2 \times 10^{-50}$ [$\text{cm}^4 \text{ s}$]	$\eta \times \sigma_3 \times 10^{-83}$ [$\text{cm}^6 \text{ s}^2$]
DAPI (ungebunden)	1,3 (345 nm)	0,16 (700 nm)	0,25 (1000 nm)
Indo-1 (mit Ca^{2+})	1,3 (340 nm)	1,5	6
Indo-1 (frei)	1,3 (345 nm)	3,5	2
Fura-2 (mit Ca^{2+})	1,2 (335 nm)	12	30
Fura-2 (frei)	1,0 (362 nm)	11	20
Di-I	4,9 (500 nm)	200	—
Rhodamine B	1,3 (500 nm)	200	—

Analog zur Einphotonenanregung lässt sich auch hier die Sättigungsintensität berechnen, indem man $k_2 = 1/\tau$ setzt. Durch Umformen findet man $I_2^{\text{sat}} = \hbar\omega(\sigma_2\tau)^{-1/2}$. Nach Einsetzen der Zahlenwerte für Rhodamin B erhält man als Sättigungsintensität $I_2^{\text{sat}} \approx 5200 \text{ MW/cm}^2$. Das liegt vier Größenordnungen über dem für Einphotonenmikroskopie. Rechnet man diesen Wert mit Hilfe der Apertur in die mittlere Lichtleistung um, so erhält man $\bar{P} \leq 5 \text{ W}$.

Diese Lichtleistung ist so hoch, dass man in einer biologischen Probe mit unerwünschten Nebeneffekten rechnen müsste. Dazu gehören Erwärmung durch Einzelphotonenabsorption der Zellsubstanzen, wie z.B. des Wassers in der Zelle, welches im Infrarotlicht ab 680 nm mit zunehmender Wellenlänge stärker absorbiert. Bei einer Leistung von $P = 5 \text{ W}$, der Wellenlänge $\lambda = 850 \text{ nm}$, einer Ortsverweildauer von 1 ms kann man davon ausgehen, dass sich das Wasser im Fokus um ca. 3–6 K erhöht. Darüber hinaus gibt es den Effekt der optischen Pinzette: strahlt man Licht in ein Medium, in dem sich Mikropartikel befinden, deren Brechungsindex etwas größer ist als der des Mediums, so werden diese aufgrund von auftretenden dielektrischen Lichtkräften in den Lichtstrahl hineingezogen und vom Strahl wie von einer Pinzette mitgeführt. Sicherlich hängt das Mitführen von der Viskosität des Mediums, von der Geschwindigkeit, mit welcher der Strahl durch die Probe bewegt wird, von der Größe der Partikel und dem Brechungsindexunterschied ab. Man kann aber festhalten, dass ab einer Durchschnittsleistung von etwa 30–50 mW der Effekt der optischen Pinzette im Auge zu behalten ist.

Es ist daher naheliegend, Zweiphotonenanregung mit einem gepulsten Laser zu betreiben. In der Tat ist die zur Zeit am häufigsten verwendete Lichtquelle der modengekoppelte Titan-Saphir-Laser, der typischerweise Pulse der Dauer von $\Delta t = 100\text{--}200 \text{ fs}$ in dichter zeitlicher Abfolge (von 12,5 ns) emittiert. Die Pulswiederholrate f beträgt somit 80 MHz. Die hohe zeitliche und räumliche Konzentration von Photonen die durch die Fokussierung und das Pulsen zustande kommt, begünstigt die Zweiphotonenabsorption bei einer gegebenen quasikontinuierlichen Leistung. Letztere gibt die Leistung an, die man durch zeitliche Mittelung über viele Pulse erhält und ist proportional zum Gesamtfluss der Photonen. Diese Größe ist für den Praktiker von Bedeutung, da sie letztendlich auch die Größe ist, die direkt von einem gewöhnlichen Leistungsmessgerät angezeigt wird.

Nimmt man der Einfachheit halber an, dass es sich bei den emittierten Pulsen um Rechteckpulse mit der Intensität I_{peak} handelt, so ergibt sich die durchschnittliche Absorptionsrate pro Sekunde und Molekül jetzt zu

$$k_2 = \frac{f \Delta t \sigma_2 I_{\text{peak}}^2}{(\hbar\omega)^2} = \frac{\sigma_2 I_{\text{ave}}^2}{f \Delta t (\hbar\omega)^2} \equiv \frac{\xi \sigma_2 I_{\text{ave}}^2}{(\hbar\omega)^2}, \quad (9.9)$$

wobei wir berücksichtigt haben, dass sich die zeitlich gemittelte Durchschnittsintensität aus $I_{\text{ave}} = I_{\text{peak}} f \Delta t \equiv I_{\text{peak}}/\xi$ berechnet. Vergleicht man (9.9) mit (9.8), so erkennt man, dass sich bei einer festgelegten quasikontinuierlichen Intensität die Fluoreszenzrate um den Faktor ξ erhöht. Mit den Leistungsdaten des Titan-Saphir-Laser erhält man einen beachtlichen Faktor von

$\xi = 6,25 \times 10^4$, sodass man bereits mit geringeren quasikontinuierlichen Leistungen brauchbare Signale erzielen kann.

Es lohnt sich, die Intensität wieder auf die räumlich gemittelte fokussierte Leistung umzurechnen:

$$k_2 = \frac{\xi \sigma_2 P_{\text{ave}}^2}{(\hbar\omega(\pi\Delta r)^2)^2} = \frac{P_{\text{ave}} P_{\text{peak}} \sigma_2}{(\hbar\omega(\pi\Delta r)^2)^2}. \quad (9.10)$$

Die Formulierung auf der rechten Seite von (9.10) hat den Vorteil, dass sie leicht zu merken ist; die Fluoreszenzausbeute in der Zweiphotonenmikroskopie ist proportional zum Produkt aus Puls- und quasikontinuierlicher Leistung. Der Vorteil des gepulsten Lichts in Bezug auf die Ausbeute lässt sich anhand eines trivialen Beispiels festmachen: 5 mW des Titan-Saphir-Strahls ist genauso effizient wie $250 \times 5 \text{ mW} = 1,25 \text{ W}$ an kontinuierlichen Licht.

Es lohnt sich jetzt, eine quasikontinuierliche Leistung abzuschätzen, bei der Sättigung eintreten muss. Der direkte Vergleich von (9.8) und (9.9) zeigt, dass die mittlere Sättigungsintensität im gepulsten Fall um den Faktor $\sqrt{\xi}$ geringer ist als bei kontinuierlicher Einstrahlung. Für die Leistungsdaten des Titan-Saphir-Lasers erhält man $\sqrt{\xi} = 250$. Vorsicht ist allerdings angebracht, wenn man mit Lichtleistungen in der Nähe der Sättigung arbeitet. Für das Beispiel von Rhodamin B würde man danach mit Hilfe eines Titan-Saphir-Lasers bei einer quasikontinuierlichen Leistung von $P_{\text{ave}} \leq 5 \text{ W}/250 = 20 \text{ mW}$ die Sättigung erreichen. In Wirklichkeit führen gepulste Laser schon früher zu Sättigungseffekten, weil der Farbstoff innerhalb der kurzen Pulsdauer nicht in den Grundzustand zurückkehren kann. Die genaue Beschreibung des Verhaltens des Farbstoffmoleküls bedarf der Beschreibung durch das Differentialgleichungssystem; trotzdem lassen sich (9.9) und (9.10) gut für die Effizienz der Zweiphotonenanregung bei einer bestimmten Apertur und Lichtleistung verwenden.

Die quantenmechanischen Auswahlregeln für Ein- und Zweiphotonenabsorption sind verschieden. Für isolierte Atome gilt sogar, dass sich Ein- und Zweiphotonenübergänge zwischen denselben Zuständen einander ausschließen. Für die ziemlich komplexen Farbstoffmoleküle ist dies nicht pauschal übertragbar, vermutlich weil die komplizierten Schwingungszustände des S_0 und insbesondere des S_1 und die damit verbundene Aufhebung von Molekülsymmetrien Anregungswege offen lassen. Quantenmechanische Berechnungen des Wirkungsquerschnitts der Zweiphotonenanregung (Störungstheorie 2. Ordnung) sind aufgrund der Komplexität nicht immer gangbar oder brauchbar, sodass die zuverlässigsten Daten aus Messungen stammen. Während man σ_1 sehr gut aus Absorptionsmessungen des eingestrahlten Lichts (Lambert-Beer-Gesetz) bestimmen kann, stellt die direkte Messung von σ_2 aufgrund der geringen direkten Absorption eine Herausforderung dar. Brauchbare Ergebnisse erzielt man, wenn man σ_2 aus Zweiphotonenfluoreszenzanregungen bestimmen kann, was allerdings die Kenntnis der Quantenausbeute η voraussetzt.

Mittlerweile findet man in der Literatur für den Anwender brauchbare Messungen von Zweiphotonenwirkungsquerschnitten. Für ihn stellt sich auch die Frage, ob man aus den Einphotonenabsorptionsspektren auf die Zweiphotonenabsorption schließen kann. Die bisherige Erfahrung ist, dass die meisten gängigen Farbstoffe, die bei λ einen Einphotonenübergang haben, in der Regel auch bei 2λ im Zweiphotonenmodus angeregt werden können. Damit wird die Zweiphotonenmikroskopie für die Fluoreszenzmikroskopie sehr attraktiv. Oft ist das Zweiphotonenanregungsspektrum leicht blauverschoben, d.h. die optimale Anregung erfolgt bei Wellenlängen, die etwas (ca. 20–80 nm) kürzer sind als 2λ .

In den letzten zwei Jahren hat sich herausgestellt, dass neben der Zweiphotonenmikroskopie auch Dreiphotonenmikroskopie möglich ist. Hier erfolgt die Anregung durch die simultane Absorption von drei Photonen der Wellenlänge von 3λ . Der Farbstoff DAPI, der üblicherweise zur Färbung des Zellkerns verwendet wird, besitzt bei ca. 360 nm ein Einphotonenabsorptionsmaximum. Er lässt sich im Bereich 640–830 nm im Zweiphotonenmodus anregen und von 900–1060 nm im Dreiphotonenmodus. Zwischen 830–900 nm liegt ein Übergangsbereich, bei dem in der Regel eine gemischte Anregung vorliegt; ist die Intensität hoch, so überwiegt der Dreiphotoneneffekt, ansonsten erfolgt die Anregung durch zwei Photonen. Der Grund ist, dass die Dreiphotonenanregung – wie nach dem Vorhergehenden zu erwarten – von der dritten Potenz der Intensität abhängt. Hohe Intensitäten begünstigen den Dreiphotonenprozess. In Analogie zu (9.9) und (9.10) gilt für die Zahl der Fluoreszenzphotonen pro Molekül und Sekunde

$$k_3 = \frac{f \Delta t \sigma_3 I_{\text{peak}}^3}{(\hbar\omega)^3} = \frac{\xi^2 \sigma_3 I_{\text{ave}}^3}{(\hbar\omega)^3} = \frac{P_{\text{ave}} P_{\text{peak}}^2 \sigma_3}{(\hbar\omega (\pi \Delta r)^2)^3}. \quad (9.11)$$

Der Dreiphotonenwirkungsquerschnitt hat die Einheit $\text{cm}^6 \text{s}^2$. Für nicht an DNA gebundenes DAPI wurde bei $\lambda = 1000 \text{ nm}$ ein Dreiphotonenwirkungsquerschnitt von $\sigma_3 = 0,25 \times 10^{-83} \text{ cm}^6 \text{s}^2$ bestimmt.

Die Proportionalität zu ξ^2 bedeutet, dass die Fluoreszenz bei fester quasikontinuierlicher Leistung umgekehrt quadratisch mit der Pulsbreite zunimmt; bei der Zweiphotonenanregung war das nur linear. Hält man die quasikontinuierliche Leistung konstant und verkürzt dabei die Pulsbreite um die Hälfte, so verdoppelt sich das Zweiphotonensignal nur, während sich das Dreiphotonensignal vervierfacht. Im Prinzip suggerieren diese Formeln, dass man Multiphotonenmikroskopie am besten mit möglichst kurzen Pulsen durchführt. Als einzige Limitation verbliebe die mit immer kürzeren Pulsen verbundene immer größere spektrale Bandbreite des Lichts (bei 800 nm und 120 fs Pulsen misst man bereits eine spektrale Bandbreite von ca. 10–12 nm) und die vorhin diskutierte Sättigung des Moleküls durch einen einzelnen Puls. In der Tat wird deshalb Zweiphotonenmikroskopie zur Zeit fast ausschließlich mit gepulsten Titan-Saphir-Lasern betrieben, die Pulse der Größenordnung von 100–300 fs liefern.

9.2.4 Limitierende Effekte in der Multiphotonenmikroskopie

In Wirklichkeit ist die Situation komplexer, denn außer Erwärmung durch Einphotonenabsorption und dem Effekt der optischen Pinzette, die ja linear von der quasikontinuierlichen Leistung abhängig sind, gibt es auch limitierende Effekte höherer Ordnung. Diese werden durch das Verkürzen der Pulse genauso begünstigt wie die Multiphotonenanregung und setzen der erreichbaren Fluoreszenzausbeute obere Grenzen. Dieses Gebiet ist noch Gegenstand der Forschung, sodass man zur Zeit wenig Quantitatives darüber aussagen kann. Auf jeden Fall gehören dazu die Photozerstörung des Farbstoffs durch (kaskadierte) Anregung in ein höheres elektronisches Niveau, $S_{n>2}$, aus dem heraus das Molekül unwiederbringlich chemisch verändert wird. Weitere Kandidaten sind Streuprozesse höherer Ordnung bis hin zum dielektrischen Durchbruch des Probenmaterials. Letzteres bedeutet, dass die im Fokus vorhandene Feldstärke deutlich größer wird als die typischen Feldstärken (10^9 V/m), mit denen die Elektronen an den Atomrumpf gebunden sind. Werden einzelne Elektronen aus dem Atomverband herausgeschlagen, so können sie aufgrund der weiteren Beschleunigung durch die Lichtpulse zu einer Stoßlawine und zur Bildung eines lokalen Plasmas führen, das sich als heller Blitz bemerkbar macht. Fokussiert man Titan-Saphir-Laserlicht (200 fs Pulse) der Wellenlänge von 700–800 nm und der quasikontinuierlichen Leistung von ca. 30–40 mW mit hoher Apertur in Immersionsöl, so kann man diesen Effekt gut beobachten; bei Glyzerin und Wasser liegt die Schwelle höher. In der Regel ist dieser Effekt nur die oberste Grenze, weil i. Allg. schon bei geringeren Leistungen andere Mechanismen auftreten. Die Zahlen für die quasikontinuierliche Leistung sind aber nur als Richtwerte zu verstehen, die dem Praktiker eine Orientierung verleihen. Ungewissheiten ergeben sich auch aus spezifischen Gegebenheiten der Probe. Fokussiert man beispielsweise sehr tief in die Probe, sodass aufgrund objektinduzierter Aberrationen oder von starken Streuungen die Spitzenintensität abnimmt, so sind natürlich höhere Durchschnittsleistungen erforderlich und tolerierbar; letzteres deshalb, weil die Spitzenintensität durch die Probe selbst reduziert wird.

Durchläuft ein nahezu Fourier-limitierter 120 fs Puls der Zentralwellenlänge von 800 nm (spektrale Bandbreite von ca. 12 nm) die zahlreichen optischen Komponenten des Mikroskops, so werden seine spektralen Komponenten dispergieren. Im Allgemeinen hinkt der blaue Spektralanteil dem roten hinterher, und am Objekt liegt eine Pulsdauer von ca. 250 fs vor. Möchte man bei der gleichen Durchschnittsleistung die beste Ausbeute erzielen, so kann man den Strahl vor Eintreten in das Mikroskop durch ein Prismenpaar führen, das eine Dispersion umgekehrten Vorzeichens einführt und die der Komponenten aufhebt. Hier stellt sich die Frage, inwieweit dies erforderlich ist. Die Antwort darauf lautet: Wird die Fluoreszenzausbeute durch lineare Effekte begrenzt, wie z.B. Erwärmung der Probe durch lineare Absorption oder durch den Effekt der optischen Pinzette, so ist eine Kürzung der Pulsdauer vorteilhaft oder sogar erforderlich. Sind die begrenzenden Prozesse quadratisch von

der eingestrahlten Intensität abhängig, so ist die Pulsbreite für die Zweiphotonenmikroskopie kaum relevant, denn eine Verkürzung der Pulsbreite würde auch zu einer Erhöhung der Zerstörwahrscheinlichkeit führen. Für die Dreiphotonenmikroskopie würde eine Verkürzung allerdings noch vorteilhaft sein. Sind die limitierenden Prozesse der Ordnung drei oder höher, so ist kein Vorteil durch die Verkürzung der Pulsdauer gegeben. Zur Zeit können noch keine allgemeingültigen Aussagen über alle limitierenden Prozesse gemacht werden – und wahrscheinlich wird sich dies aufgrund der molekularen Komplexität biologischer Proben nicht so schnell ergeben.

Dennoch lassen sich einige Effekte bis zu einem gewissen Grad eingrenzen. Man weiß aus Rechnungen und Experimenten, dass das Aufheizen von Wasser in der Multiphotonenmikroskopie im üblichen Wellenlängenbereich von 600–1070 nm eine vernachlässigbare Rolle spielen wird. Wenn die Proben nicht Moleküle enthalten, die im nahen Infrarot linear absorbieren, wie dies bei bestimmten Pflanzen- oder Blutzellen der Fall ist, so kann man davon ausgehen, dass man ungepulst mit kontinuierlichen Leistungen von 100–300 mW arbeiten kann. Der limitierende Effekt wäre dann durch den Effekt der optischen Pinzette gegeben. Eine Reihe von Experimenten weist darauf hin, dass die meisten Photobleichmechanismen quadratisch oder höherer Ordnung sind. Beispielsweise wird die hochauflösende Abbildung ($NA = 1,35$) von DAPI-gefärbten Zellkernen in der Regel mit $P_{ave} = 3 \text{ mW}$, $\tau = 150 \text{ fs}$ und $f = 80 \text{ MHz}$ betrieben. Steigert man P_{ave} über 5 mW hinaus, so zeigen sich limitierende Effekte in Form von Bleichen. Man kann aber durchaus ungepulstes Licht der Durchschnittsleistung von 100–150 mW einstrahlen, ohne die Probe zu bleichen. In Kombination mit dem Wissen über die Vernachlässigbarkeit des Heizens bedeutet das, dass man in vielen Fällen mit Pulsbreiten im Pikosekundenbereich und sogar mit kontinuierlichem Licht gute Zweiphotonenbilder erzielen kann.

Aus (9.9) folgt, dass man mit 10-mal längeren Pulsen (1,5 ps) und gleicher Pulswiederholrate genauso effizient wie mit 150-fs-Pulsen Zweiphotonenmikroskopie betreiben kann, wenn man die quasikontinuierliche Leistung auf $P_{ave} \sqrt{\xi_{fs}/\xi_{ps}} = P_{ave} \sqrt{10} \approx 3,2 P_{ave} \approx 9,6 \text{ mW}$ erhöht. Dies ist immer noch ein verhältnismäßig geringer Wert. Um die gleiche Effizienz mit kontinuierlichem Licht zu erreichen, müsste man die Leistung auf $\sqrt{\xi_{fs}} = P_{ave} \sqrt{83333} \approx 289 P_{ave}$ erhöhen; das entspricht einer Leistung von 800 mW. Bedenkt man, dass der Strahl eines Laserrastermikroskops sehr schnell über die Probenpunkte hinwegbewegt wird und das gängigste Einbettmedium von fixierten Zellen, Glyzerin, sehr viskos ist, so kann man davon ausgehen, dass der Effekt der optischen Pinzette nur einen verminderten Einfluss hat. In der Tat kann man mit kontinuierlichem Licht der Leistung von ca. 100 mW respektable Zweiphotonenbilder von DAPI-Zellkernen aus Zellkulturen erzielen.

Gleichung (9.11) deutet an, dass für eine effiziente Dreiphotonenmikroskopie kurze Pulsdauern notwendig sind. Dreiphotonenmikroskopie birgt daher, mehr noch als die Zweiphotonenmikroskopie, das Risiko der Fluorophor-

oder Probenzerstörung durch nichtlineare begrenzende Effekte. Sollten zukünftige Forschungen ergeben, dass die nichtlinearen limitierenden Mechanismen kubischer oder höherer Ordnung sind, so wäre die Verwendung von Pikosekundenpulsen gegenüber den jetzt standardmäßig verwendeten Femtosekundenpulsen generell vorzuziehen. Pulse im 2–10 ps Bereich haben auch den Vorteil, dass sie in der Regel Laser-technisch leichter herzustellen sind und aufgrund ihrer engen spektralen Bandbreite (< 0,1 nm) mühelos über Glasfasern vom Laser zum Mikroskop transportiert werden können, weil die Dispersion vernachlässigbar ist.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass man durch Femtosekundenpulse im Prinzip das Signal der Zweiphotonenmikroskopie erhöht, dass es aber eine Vielzahl von Experimenten gibt, die zeigen, dass man effiziente Zweiphotonenmikroskopie auch mit Pikosekundenpulsen und in Einzelfällen sogar mit kontinuierlich eingestrahltem Licht durchführen kann. Wird das Laserlicht sehr stark gestreut, so sind wiederum kurze Pulse im Vorteil, weil man mit weniger Lichtleistung auskommt. Die Durchführbarkeit hängt also in hohem Maß vom Farbstoff und den optischen Eigenschaften der Probe ab.

9.2.5 Die Detektionseffizienz eines Rastermikroskops

Ein wichtiger Aspekt bei der Bestimmung der detektierten Fluoreszenzrate ist die Detektionseffizienz des Mikroskopaufbaus selbst. Leider wird der größte Teil der emittierten Photonen erst gar nicht gemessen. Dabei spielt die Sensitivität des Detektors eine entscheidende Rolle. Die typische Quanteneffizienz von Photomultipliern liegt bei 15–20% (bei $\lambda = 450$ nm) bis herunter zu 2–4% (bei $\lambda = 700$ nm). Aufgrund des begrenzten Aperturwinkels werden selbst bei hohen Aperturen (1,2–1,4 Öl) lediglich 20–30% der emittierten Photonen aufgesammelt. Bedenkt man, dass die Mikroskope einschließlich der Filter nur eine Transmission von 50–70% haben, so erhält man als Richtwert für die Detektionseffizienz $\delta = 0,10 \times 0,20 \times 0,6 \approx 0,01$. D.h., nur 1% der emittierten Photonen werden tatsächlich als Signal registriert. Siliziumdetektoren haben Quantenausbeuten von 50–70% im grün-gelb-roten Spektralbereich, aber sie sind rauschempfindlicher. Letzteres kann man unterbinden, indem man sie als Photonenzähler betreibt, aber dadurch ist die maximale Zählrate auf 2×10^6 /s begrenzt. Sie sind daher (nur) bei schwachen Signalen von Vorteil.

9.2.6 Anwendungsbeispiele der Multiphotonenmikroskopie

Trotz der noch nicht vollständig geklärten Limitationen gibt es bereits beeindruckende Anwendungsbeispiele in der biomedizinischen Forschung. Dies ist nicht zuletzt darauf zurückzuführen, dass fast alle gängigen Fluorophore multiphotonenanregbar sind. Aber auch viele intrinsischen Farbstoffe der Zelle lassen sich durch die simultane Absorption von zwei oder drei Photonen zur Fluoreszenz anregen. Beispiele dafür sind Pollenkörner, die eine

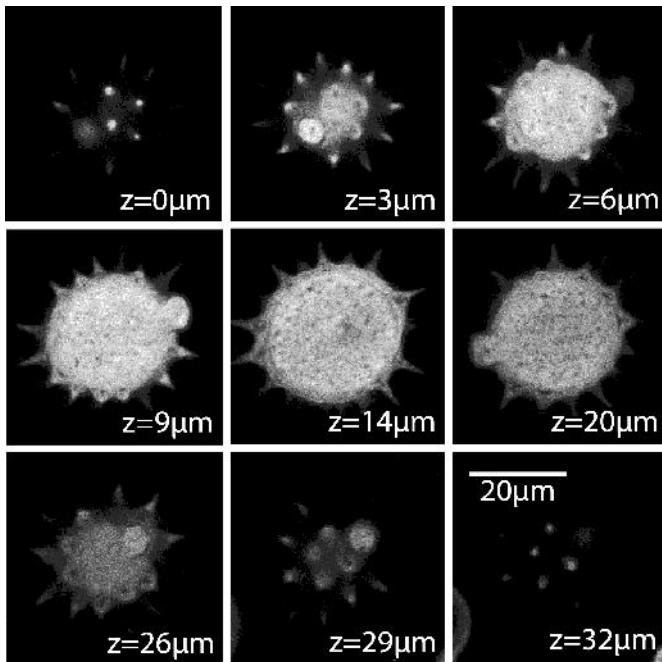


Abb. 9.5. Multiphotonenaufnahme eines autofluoreszierenden Pollenkorns in verschiedenen Ebenen (xy -Schnitte) senkrecht zur optischen Achse (z); Anregungswellenlänge von 1064 nm eines Lasers mit 7 ps Pulslänge und 200 MHz Pulsserienrate

sehr ausgeprägte Zweiphotonenfluoreszenz zeigen. Abbildung 9.5 zeigt xy -Bilder (laterale Schnitte) durch ein ca. 50 μm großes Pollenkorn und eine dreidimensionale Rekonstruktion desselben mittels Volumendarstellung (volume rendering). Die numerische Apertur des Objektivs ist 1,4 (Ölimmerision), und die Anregungswellenlänge ist 1064 nm. Der Laser ist ein gepulster ND:YVO₄, der Pulse der Dauer von $\tau = 7$ ps bei einer Repetitionsrate von $f = 200$ MHz durchführt, d.h. $\xi \approx 715$. Die quasikontinuierliche Leistung betrug $P_{\text{ave}} \approx 20$ mW. Die Pixelverweildauer betrug 8 μs . Die Bildserie zeigt deutlich den dreidimensionalen Charakter der zweiphotonenmikroskopischer Aufnahmen.

Abbildung 9.6 zeigt eine Zweiphotonenaufnahme von menschlichem Hautgewebe, das mit dem Farbstoff Acridin Orange angefärbt wurde. Die Aufnahme wurde mit demselben Laser durchgeführt. Die durchschnittliche Pixelverweildauer des Strahls betrug ca. 8 μs , und die Pixelgröße war 0.5 μm in beiden Achsen. Das verwendete Rastermikroskop war eine für Multiphotonenmikroskopie modifizierte Version eines kommerziell erhältlichen Rastermikroskops (Leica TCS NT, Heidelberg).

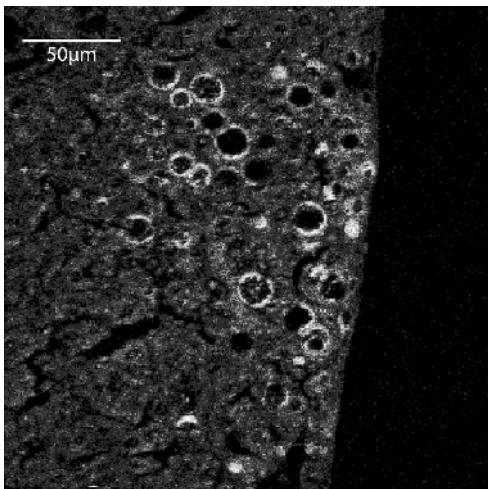


Abb. 9.6. Zweiphotonenbild menschlichen Hautgewebes gefärbt mit dem Farbstoff Acridine Orange

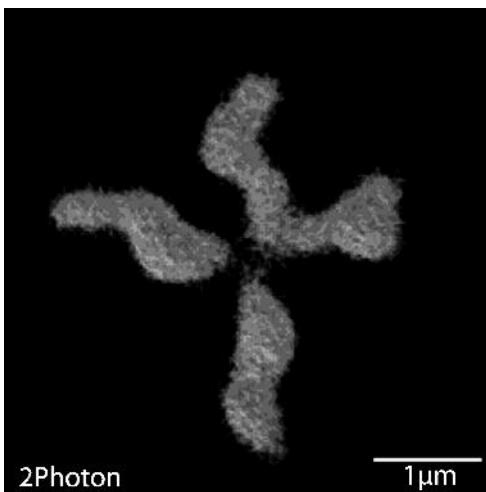


Abb. 9.7. Zweiphotonen-3D-Volumenbild eines menschlichen Chromosoms; Anregungswellenlänge 790 nm, Pulslängen von 250 fs und 76 MHz Pulsrepetitionsrate (Titan-Saphir-Laser)

Abbildung 9.7 zeigt wiederum ein 3D-Volumenbild eines menschlichen Metaphasenchromosoms extrahiert aus einer HeLa-Zelle. Diese Aufnahme besteht ursprünglich aus 50 XY-Schnitten der Größe $5 \times 5 \mu\text{m}$, die im axialen Abstand von 80 nm aufgenommen wurden. Die Pixelgröße betrug $35 \times 35 \text{ nm}$ und die Pixelverweildauer 2 ms. Hier wurde im Gegensatz zu vorhin nicht

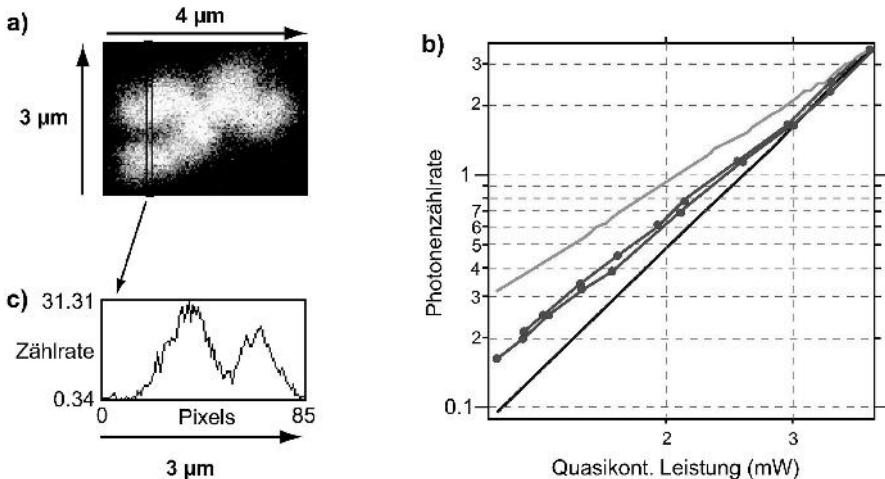


Abb. 9.8. (a) Multiphoton-*xy*-Bild eines menschlichen Chromosoms angeregt bei 970 nm mit 250-fs-Pulsen; (b) Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Leistung des anregenden Lichts; (c) Profil durch Datensatz aus (a)

der Strahl über die Probe gerastert, sondern die Probe bewegt. Als Farbstoff diente DAPI. Die Anregung erfolgte mittels eines modengekoppelten Titan-Saphir-Lasers (Coherent Mira 900F) bei der Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 790$ nm und mit Pulsen von $\tau \approx 150$ fs. Die mittlere Leistung P_{ave} im Fokus betrug ca. 4 mW und die Pulstrepetitionsrate $f = 76$ MHz. Abbildung 9.8a zeigt ein einzelnes XY-Bild eines ähnlich präparierten Chromosoms, das unter gleichen Bedingungen im Dreiphotonenmodus aufgenommen wurde; die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 970$ nm. Abbildung 9.8b zeigt ein Profil durch die Daten, und Abb. 9.8c zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Anregungswellenlänge P_{ave} . Man erkennt, dass man erst bei höheren Leistungen eine nahezu exakte dritte Potenz der nichtlinearen Abhängigkeit bekommt.

Es gibt eine Reihe weiterer Anwendungen der Zweiphotonenmikroskopie, die, obwohl hier nicht bildlich dargestellt, sehr wichtig sind. Aufgrund seiner Fähigkeit in tiefere Bereiche streuender Proben einzudringen, wird dieses Verfahren zunehmend in der Neurophysiologie eingesetzt. Hier erlaubt die Zweiphotonenmikroskopie die Beobachtung der Funktion von Nervenzellen in lebenden Gehirnschnitten. Von ähnlich großem Potential sind Beobachtungen von tieferen Regionen der Haut, die mit Einphotonenmikroskopie aufgrund zu starker Streuung kaum zugänglich wären. Potential hat auch die gezielte photochemische Freisetzung von bestimmten Verbindungen (caged compounds) im Innern der Zelle. Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung von ATP und von verschiedenen Farbstoffen wie Rhodamine. Denkbar ist ebenfalls die dreidimensionale Freisetzung reaktiver Verbindungen zur photodynamischen Chemotherapie in der Krebsbekämpfung. Für weitere Anwendungen sei hier auf die weiterführende Literatur verwiesen.

9.2.7 Auflösung der Ein- und Multiphotonenmikroskopie

Wie ist es nun mit der Auflösung der Zweiphotonenmikroskopie bestellt? Abbildung 9.2c zeigt die PSF des Zweiphotonenmikroskops bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm und einer Apertur von 1,35 (Öl). Die Fluoreszenzwellenlänge hat keinen Einfluss auf die Auflösung, weil die effektive PSF allein durch die Anregung bestimmt ist. Vergleicht man nun die PSF des Zweiphotonenmikroskops mit der des einphotonenkonfokalen Mikroskops, so stellt man fest, dass die Auflösung der ersteren sowohl in axialer als auch in lateraler Richtung etwas geringer ist. Zwar bringt das Quadrieren aus (9.4) eine Verengung der PSF mit sich, dies wird aber von der doppelten Anregungswellenlänge wettgemacht. Letztendlich wiegt dies schwerer, da die Ausdehnung der PSF proportional zur Wellenlänge ist.

Prinzipiell wäre es auch möglich, Farbstoffe anzuregen, deren Einzelphotonenabsorption im nahen UV wie z.B. bei 250 nm liegen mit einer Emission bei 280–300 nm. Dann könnte man auch mit einer kürzeren Wellenlänge, also um 450–500 nm, anregen und tatsächlich eine höhere Auflösung erzielen. In der Praxis stößt man aber auf Hürden. Zum einen nimmt die Transmission der Mikroskopobjektive im nahen UV ab – aber noch schwerer wiegt, dass im Gegensatz zum Infrarotlicht intensives oder intensiv gepulstes kurzwelliges Licht (lebenden) biologischen Proben schadet.

Diese Überlegung lässt sich auch für die Dreiphotonenmikroskopie fortsetzen. Obwohl ein Prozess höherer Ordnung stattfindet, der zu einer Verengung der PSF in allen Raumrichtungen führt, wird dieser Effekt in der Regel durch die längere Anregungswellenlänge wettgemacht. Eine Ausnahme liegt vor, wenn verschiedene Farbstoffe bei derselben Wellenlänge angeregt werden, aber der eine im Zwei- und der andere im Dreiphotonenmodus. In diesem Fall macht sich die kubische Potenz in Form eines schärferen effektiven Fokus bemerkbar. Es ist an dieser Stelle allerdings zu bemerken, dass Dreiphotonenbilder i. Allg. verrauschter sind. Die Nähe zu unerwünschten oder zerstörerischen Effekten höherer Ordnung setzt der verwendbaren Intensität und damit der Signalausbeute Grenzen. Meistens wird die engere PSF durch zunehmendes Rauschen maskiert. Ähnliche Überlegungen sind angebracht, wenn man die Auflösung des Zweiphotonenmikroskops mit dem des konfokalen Mikroskops vergleicht. Im Prinzip ist der effektive Fokus des Einphotonenmikroskops schärfer, aber bei stark streuenden Proben können Zweiphotonenbilder mehr Detailinformationen liefern als ihr Einphotonen-pendant.

9.2.8 Konfokale Multiphotonenmikroskopie

In der Multiphotonenmikroskopie ist die 3D-Auflösung bereits durch die nichtlineare Art der Anregung gegeben; die Verwendung eines punktförmigen Detektors ist daher überflüssig. Dennoch lässt sich ein Punktdetektor

unter Verlust von Fluoreszenzlicht sinnvoll einsetzen, um die PSF zu verengen und die Auflösung zu steigern. Der Punktdetektor gewährleistet, dass nur das Licht gemessen wird, das vom Objektpunkt direkt in die Lochblende abgebildet wird. Analog zum konfokalen Mikroskop muss man jetzt eine Detektions-PSF berücksichtigen, was zu folgender effektiven PSF führt:

$$h_{2\text{-Phot}}^{\text{conf}}(u, v) = h_{\text{ill}}^2\left(\frac{u}{2}, \frac{v}{2}\right) h_{\text{det}}(u, v). \quad (9.12)$$

Aufgrund der etwa halb so kurzen Fluoreszenzwellenlänge ist die Detektions-PSF im Vergleich zur Beleuchtungs-PSF nur etwa halb so ausgedehnt. Daher schneidet die Detektions-PSF quasi den Innenbereich der Beleuchtungs-PSF heraus, sodass die effektive PSF insgesamt enger wird. Dies lässt sich sowohl aus Abb. 9.2d als auch aus den dazugehörigen Profilen (Abb. 9.3) entnehmen.

Mit der deutlichen Verengung der PSF ist auch ein Signalverlust verbunden, was insbesondere bei streuenden Proben nachteilig ist. Darauf hinaus erfordert die Verwendung der Lochblende eine – sonst überflüssige – präzise Justage. In Einzelfällen kann aber das Verwenden von Lochblenden vorteilhaft sein. Man kann beispielsweise etwas größere Lochblenden wählen (vom Radius $v = 5\text{--}7$ in optischen Einheiten), die nur zu relativ geringen Signaleinbußen führen. Ist die PSF mit sphärischen Aberrationen behaftet, so lassen sich damit merkliche Verbesserungen der axialen Auflösung erzielen – in einem vernünftigen Kompromiss zum SNR. Falls genügend Bildaufnahmzeit oder Signal vorhanden ist, kann man die Auflösung der Zweiphotonenmikroskopie an die der 1-Photonen konfokalen Mikroskopie heranführen (Abb. 9.3a,b). Der effektive Fokus wird enger und damit auch die Sonde mit der das Objekt abgerastert wird.

9.3 Point-Spread-Function-Engineering als Ansatz zur Auflösungserhöhung im Fernfeldmikroskop

Der effektive Fokus als dreidimensionale Sonde ist ein idealer Ausgangspunkt für die Auflösungserhöhung im Fernfeldlichtmikroskop. Die Auflösungserhöhung reduziert sich somit auf die Frage: Wie kann man – unter Beibehaltung eines möglichst hohen Signals – die spatiale Ausdehnung des effektiven Fokus verringern? In Anbetracht der Tatsache, dass die axiale Auflösung mindestens dreimal schlechter ist als die laterale, bietet es sich zunächst an, die axiale Auflösung zu steigern. Dabei ist die Erhöhung der axialen Auflösung nicht weniger wichtig als die der lateralen. Der dreidimensionale Charakter der PSF bedingt, dass sie genauso zur Gesamtunschärfe beiträgt wie die laterale. Es ist naheliegend und sicherlich auch einfacher, als Erstes die Erhöhung der axialen Auflösung in Angriff zu nehmen.

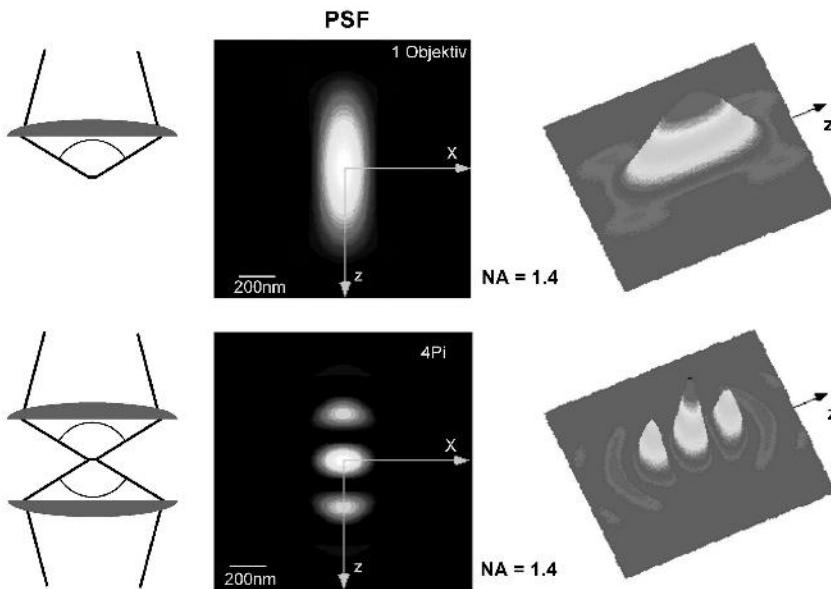


Abb. 9.9. Die *gerechnete* fokale Intensitätsverteilung (PSF) eines einzelnen Objektivs (*obere Reihe*) und bei der kohärenten Verwendung zweier Objektive hoher numerischer Apertur, wie sie dem 4π -konfokalen Mikroskop zu Grunde liegt (*untere Reihe*)

9.3.1 Grundlagen der 4π -konfokalen Mikroskopie

Für die geringere axiale Auflösung gibt es eine anschauliche Erklärung, die in der Asymmetrie des Fokussierungsprozesses zu finden ist. Ein Objektiv kann eben nur einen endlichen *Ausschnitt* einer Kugelwelle erzeugen (Abb. 9.9). Wäre es eine komplette Kugelwellenfront mit einem Raumwinkel von 4π , so hätte man einen kugelförmigen Fokus, und die axiale Auflösung wäre dramatisch erhöht. Die Erzeugung einer aberrationsfreien, vollständigen Kugelwellenfront ist aber technisch kaum realisierbar. Was sich allerdings realisieren lässt, ist die Vergrößerung der Wellenfront mit Hilfe eines zweiten Objektivs, das dem ersten entgegen und auf denselben Punkt gerichtet ist. Mit zwei Objektiven lässt sich die Gesamtapertur in axialer Richtung erhöhen. Dazu müssen sich die Wellenfronten ergänzen, d.h. kohärent überlagert werden. Ist die Interferenz konstruktiv, so erhält man ein axial viermal engeres Hauptmaximum. Das engere Hauptmaximum stellt eine vierfache Verbesserung der axialen Auflösung in Aussicht.

In ganz analoger Weise lässt sich auch die Detektionsapertur erhöhen. Befindet sich ein emittierendes Punktobjekt im Fokalbereich der beiden Objektive, so kann man die emittierte Wellenfront mit beiden Objektiven erfassen. Werden die erfassten Ausschnitte in einem Punktdetektor kohärent

zusammengeführt, so ist die Detektionswellenfront vergrößert und man erhält eine genauere Information über die Lage des emittierenden Objekts. Die kohärente Verwendung zweier Objektive hoher numerischer Apertur für Beleuchtung und/oder Detektion eines Objektpunkts ist die Grundidee, auf der das 4π -konfokale Mikroskop aufbaut. Mit zwei Objektiven hoher Apertur erreicht man zwar keinen Raumwinkel von 4π — das Akronym soll aber an die Grundidee erinnern. Im Folgenden wird aber noch gezeigt werden, dass das Erreichen eines 4π -Raumwinkels gar nicht erforderlich ist.

Die 4π -Intensitäts-PSF berechnet sich demzufolge durch die Addition der Amplituden-PSF der entgegengerichteten Objektive:

$$h^{4\pi}(u, v) = \left| \widetilde{h_1}(u, v) \pm \widetilde{h_2}(-u, v) \right|^2. \quad (9.13)$$

Das Vorzeichen von u trägt der entgegengesetzten axialen Ausrichtung des zweiten Objektivs Rechnung. Das „+“ Zeichen gilt für konstruktive Interferenz, während das „-“ für destruktive Interferenz im geometrischen Fokuspunkt steht. Wie in Abb. 9.9 zu sehen, ist die 4π -Intensitäts-PSF deutlich durch die Interferenz geprägt. Außer dem ca. 4-mal engeren Hauptmaximum erhält man auch ausgeprägte Nebenmaxima (Abb. 9.9 rechts).

Der Verlauf der 4π -PSF ist stark von der Apertur abhängig. Die Zahl der Nebenmaxima nimmt mit zunehmendem Aperturwinkel, α , der Objektive ab, weil man sich mit zunehmendem α der „Idealsituation“ eines Raumwinkels von 4π nähert. Bei einem Aperturwinkel von $\alpha \geq 1,13$ ($\approx 65^\circ$) erhält man fast nur noch zwei ausgeprägte Nebenmaxima, deren Höhe ca. 65% des Hauptmaximums beträgt. Würde man den Winkel noch weiter steigern, so nähmen die Nebenmaxima schnell ab; technisch ist das leider kaum realisierbar, denn $\alpha \approx 1,13$ ist der Raumwinkel der größten Ölimmersionsobjektive. Nimmt man Objektive niedrigerer Apertur, so nimmt dagegen die Zahl und Höhe der Nebenmaxima zu, was unerwünscht ist. Deshalb sind Ölimmersionsobjektive der numerischen Apertur von $1,4 \approx 1,5 \times \sin(\alpha)$ die bevorzugten Objektive. Die Verwendung von Objektiven niedriger Apertur wäre auch ein Widerspruch zur Grundidee des „ 4π “-Mikroskops.

Abbildung 9.10 skizziert die optische Anordnung eines 4π -konfokalen Mikroskops. Das Objektiv L_2 ist fest; das Objektiv L_1 wird hochpräzise (10 nm), piezoelektrisch zu L_2 positioniert. Die Bildgewinnung erfolgt durch Rastern des Objekts durch den Fokus. Das registrierte Fluoreszenzsignal wird an einen Rechner weitergeleitet, mit dessen Hilfe das Bild dargestellt wird. Bei Abb. 9.10 handelt sich um einen *konfokalen* Aufbau, d.h. die Fluoreszenz wird auf eine Punktlochblende abgebildet. Damit ist das 4π -konfokale Mikroskop auch bei Einphotonenanregung in der Lage, dreidimensionale Bilder zu erstellen.

Die konfokale Anordnung erlaubt drei Typen von 4π -konfokaler Mikroskopie. Entweder man beleuchtet kohärent durch beide Objektive (Typ A), oder man detektiert kohärent (Typ B) oder man tut beides zugleich (Typ C). Bei Typ A hat nur die Beleuchtungs-PSF die Gestalt einer 4π -Intensitäts-

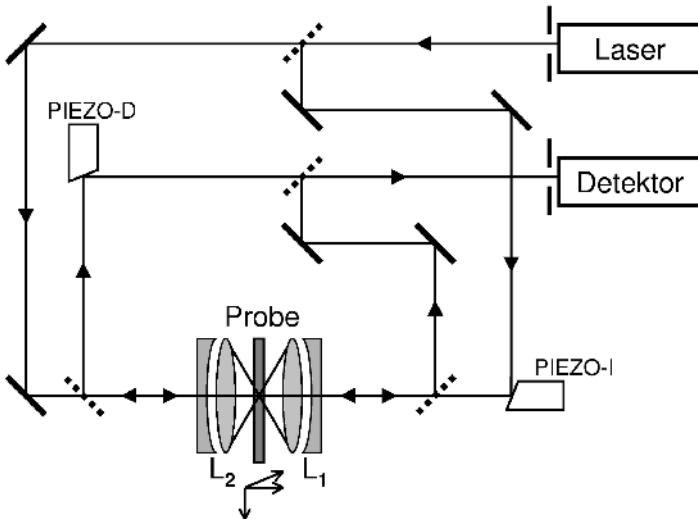


Abb. 9.10. Optische Anordnung eines 4π -konfokalen Mikroskops. Die Probe befindet sich zwischen zwei Objektiven hoher numerischer Apertur (L1, L2). Das Licht einer Punktlichtquelle wird geteilt und auf beide Objektive gerichtet, unter Beachtung von beidseitigem Wegabgleich. Ebenso kann das Licht, das von der Probe stammt, von beiden Objektiven gesammelt werden und kohärent auf einen Punktdetektor gerichtet werden. Die relative Phase der Wellenfronten wird über piezoelektrisch verstellbare Spiegel verändert

PSF, bei Typ B ist es die Detektions-PSF und bei Typ C sind es beide. Obwohl alle Verfahren realisierbar sind, ist Typ A technisch am einfachsten, weil es einfacher ist, das Laserlicht zur Interferenz zu bringen. Die effektive 4π -PSF (Typ A) ergibt sich demnach als

$$h_{\text{conf}}^{4\pi, \text{A}}(u, v) = h_{\text{ill}}^{4\pi}(u, v)h_{\text{det}}(u, v). \quad (9.14)$$

Die konfokale Anordnung verleiht nicht nur 3D-Abbildungseigenschaften, sondern schwächt auch die axialen Nebenmaxima ab. Das aus dem Hauptmaximum emittierte Fluoreszenzlicht kann die Punktlochblende besser passieren als die Fluoreszenz aus den Nebenmaxima, sodass die Nebenmaxima der konfokalen PSF typische 50% betragen. Die Detektions-PSF schneidet quasi den Innenbereich der Beleuchtungs-PSF heraus. Damit ist aber das Problem der Nebenmaxima noch nicht gelöst. Ihre Präsenz im 3D-Bild führt in der Regel zu Artefakten. Die Apertur weiter zu steigern, ist aus technischen Gründen kaum möglich. Es gibt aber auch andere Ansätze, die Nebenmaxima zu entfernen und einen scharfen Fokus zu erreichen. Die Entfernung der Nebenmaxima kann entweder auf mathematischem Wege oder mit physikalischen Methoden erfolgen.

Eine brauchbare mathematische Lösung ergibt sich, wenn man die 4π -konfokale PSF, $h_{\text{conf}}^{4\pi, \text{A}}(u, v)$ nähert als Faltung eines Einzelpeaks $h_{\text{peak}}^{4\pi}(u, v)$

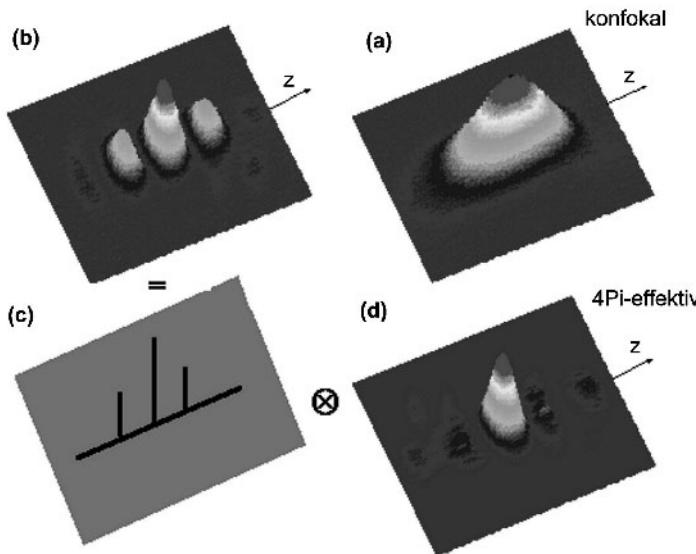


Abb. 9.11. Der *gemessene* Fokus eines (a) konfokalen und eines (b) 4π -konfokalen Mikroskops. Abbildung (c) gibt schematisch eine Funktion an, welche die Lage und Höhe der Peaks in (b) beschreibt. Entfaltet man den 4π -konfokalen Fokus aus (b) mit der inversen Funktion zu (c), so erhält man den effektiven Fokus in (d), der nur aus einem einzigen scharfen Hauptmaximum besteht. Abbildung (d) ist der effektive Fokus des 4π -konfokalen Mikroskops; er ist ca. 4-mal schärfer als der des herkömmlichen konfokalen Mikroskops in (a)

mit der Summe gewichteter Deltafunktionen $D(u) = \sum_{j=-k}^k D_j \delta(u_j)$, welche die relative Höhe und Position der Peaks beschreibt. Dies ist in Abb. 9.11 anschaulich dargestellt. Da man bei hohen Aperturen in erster Näherung mit jeweils einem oder höchstens zwei Nebenmaxima zu tun hat, gilt $k = 1, 2$. Die Höhe und Position der Peaks ist durch die Apertur, Wellenlänge und relative Phase der interferierenden Wellenfronten gegeben. Somit lassen sich die Nebenmaxima durch eine *Entfaltung* mit der zu D inversen Funktion D^{-1} entfernen. Dies ist in Abb. 9.11 mit Hilfe von Intensitätsplots demonstriert. Abbildung 9.11a zeigt die gemessene effektive PSF eines herkömmlichen konfokalen Rastermikroskops h_{conf} mit der typischen axialen Elongation. Abbildung 9.11b zeigt den Fokus des (Typ A) 4π -konfokalen Mikroskops $h_{\text{conf}}^{4\pi, A}$. In Abb. 9.11c ist die Funktion D schematisiert und in Abb. 9.11d die Einzelpeakfunktion $h_{\text{peak}}^{4\pi, A}(u, v)$. Letztere ist auch die effektive 4π -konfokale PSF (Typ A) nach der Faltung mit D^{-1} . Der unmittelbare Vergleich von Abb. 9.11a und Abb. 9.11d demonstriert eine ca. 4fache Verschärfung des Fokus entlang der optischen Achse.

9.3.2 Multiphotonen-4π-konfokale Mikroskopie

Multiphotonenanregung ist ebenfalls eine geeignete Methode, die Nebenmaxima zu reduzieren. Regt man den Farbstoff beispielsweise im Zweiphotonenmodus an, so werden die Nebenmaxima aus zwei Gründen unterdrückt: einerseits aufgrund quadratischen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Anregungsintensität und andererseits durch die Tatsache, dass bei einer Zweiphotonenanregung die Anregungswellenlänge etwa doppelt so groß ist wie die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts. Der Erste leuchtet unmittelbar ein, weil beispielsweise die relative Höhe von 65% der Nebenmaxima in solche von $(0,65)^2 \approx 42\%$ umgewandelt werden. Der Letzte lässt sich gut aus dem Zustandekommen der effektiven PSF des zweiphotonen-4π-konfokalen Mikroskops verstehen:

$$h_{\text{2phot-conf}}^{4\pi,A}(u, v) = \left(h_{\text{ill}}^{4\pi} \left(\frac{u}{2}, \frac{v}{2} \right) \right)^2 h_{\text{det}}(u, v). \quad (9.15)$$

Die Verdoppelung der Wellenlänge führt erst einmal zu einer doppelt ausgedehnten Beleuchtungs-PSF des 4π-konfokalen Mikroskops und damit auch zum doppelten axialen Abstand der Maxima. Die Detektions-PSF allerdings bleibt bei derselben Wellenlänge und behält damit ihre räumliche Ausdehnung bei. Letztendlich bedeutet das, dass die Nebenmaxima der 4π-Beleuchtungs-PSF mit niedrigeren Bereichen der Detektions-PSF überlappen. Sie tragen weniger zum Signal im Punkt detektor bei und sind damit in der effektiven PSF unterdrückt. In der Theorie erreicht man bei typischen Zweiphotonenanregungswellenlängen von $\lambda = 750\text{ nm}$, Detektionswellenlängen um $450\text{--}500\text{ nm}$, eine axiale Halbwertsbreite von 140 nm und Seitenmaxima in der Höhe von 12–15%. Für Dreiphotonenanregungswellenlängen von $\lambda = 1000\text{ nm}$ sind axiale Halbwertsbreiten von etwa 180 nm und Seitenmaxima von unter 3% vorhergesagt. In der Praxis ist die Unterdrückung nicht so effizient, weil die Korrektur der Mikroskopobjektive im Infrarotbereich unvollständig ist – es besteht ein merklicher chromatischer Längsfehler zwischen dem infraroten Anregungs- und dem sichtbaren Fluoreszenzlicht. Dies führt dazu, dass die Nebenmaxima eine relative Höhe von ca. 25–30% einnehmen. Die endgültige Eliminierung der Nebenmaxima erfolgt dann mittels der oben beschriebenen Entfaltung.

Abbildung 9.12 zeigt die Leistungsfähigkeit eines mit Zweiphotonenanregung betriebenen 4π-konfokalen Mikroskops, und zwar im direkten Vergleich mit einem herkömmlichen Zweiphotonenexzitationsmikroskop. Als Testobjekt dienten Fluoreszenzkügelchen mit einem Durchmesser von 100 nm , welche in einem Einbettungsmedium zufällig verteilt waren. Die Aufnahme des herkömmlichen konfokalen Mikroskops mit einem Objektiv zeigt die Kügelchen als in axialer Richtung ausgeschmierte helle Flecke. Die axiale Aus schmierung ist die unmittelbare Folge der Elongation des Fokus entlang der optischen Achse. Bei der hier verwendeten Apertur von 1,4 (Öl) und einer Wellenlänge von 760 nm beträgt die axiale Halbwertsbreite des Fokus etwa

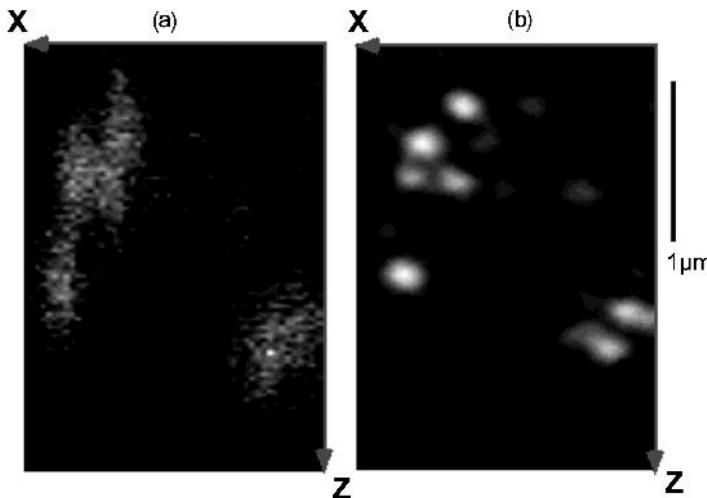


Abb. 9.12. Fluoreszierende Latexkügelchen (100 nm Durchmesser) zufällig verteilt in lateraler (x) und axialer (z) Richtung, aufgenommen mit einem (a) konfokalen und (b) 4π -konfokalen Mikroskop. Das 4π -konfokale Mikroskop gibt besser die runde Form der Kügelchen wieder und löst Kügelchen auf, die in axialer Richtung nur 100–300 nm entfernt sind

650 nm. Kügelchen, die sich innerhalb dieser Halbwertsbreite befinden, sind axial kaum zu trennen. Das 4π -konfokale Mikroskop hingegen besitzt eine effektive axiale Halbwertsbreite von ca. 140 nm. Die laterale Auflösung liegt bei etwa 200 nm in der Halbwertsbreite und ist damit von derselben Größe. Deshalb ist die 4π -konfokale Aufnahme bis auf eine kleine axiale Stauchung weniger verzerrt. Objekte, die in Abb. 9.12a nicht getrennt werden können, sind in Abb. 9.12b scharf getrennt. Aufgrund seines 4fach axial geschärften Fokus ist das 4π -konfokale Mikroskop zur Zeit das Fernfeldlichtmikroskop mit der höchsten Auflösung.

Bei allen Auflösungsvorteilen muss man auch den Zusatzaufwand und die Einschränkungen der 4π -konfokalen Mikroskopie bedenken. Ein Nachteil ist die Abhängigkeit der PSF von der relativen Phase der interferierenden Wellenfronten. In dem gezeigten Beispiel war die Interferenz konstruktiv, sodass sich ein einzelnes Hauptmaximum ausprägte. Generell ist jede beliebige Phasenbeziehung möglich, die man nicht ohne weiteres von vornherein vorhersagen kann. Um auf konstruktive Interferenz zu justieren, bedient man sich eines Tricks: man bildet ein Punktobjekt oder ein Flächenobjekt ab, das parallel zur optischen Achse gerichtet ist. Das Punktobjekt, wie z.B. eine stark lokalisierte Anhäufung von Fluoreszenzmolekülen (< 100 nm im Durchmesser) gibt in guter Näherung die 3D-PSF $h_{2\text{phot-conf}}^{4\pi,A}$ wieder. Das erlaubt die Einstellung der relativen Phase durch leichte optische Weglängenänderungen mittels eines verschiebbaren Umlenkspiegels.

Es gibt noch eine weitere Methode, die Nebenmaxima im 4π -konfokalen Mikroskop zu entfernen und die Auflösung nicht nur axial, sondern auch lateral zu steigern. Wie in jedem anderen Fluoreszenzmikroskop auch, lässt sich aus dem Bild $b(u, v)$ und bekannter effektiver PSF $h(u, v)$ auf das Objekt $t(u, v)$ rückschließen, und zwar indem man das Bild mit der (gemessenen) effektiven PSF $h(u, v)$ entfaltet. Im Prinzip könnte man die Entfaltung direkt durchführen und somit eine gewisse Restaurierung des Objekts erreichen. In Wirklichkeit ist in der Fluoreszenzmikroskopie eine direkte Entfaltung kaum praktikabel, in erster Linie wegen des zumeist unzulänglichen SNR des Bilds und der gemessenen PSF. Trotzdem ist es möglich eine Art Entfaltung – besser Objektrestauration – in einem iterativen Approximationsprozess durchzuführen. Ein entsprechender Algorithmus nimmt eine gewisse Objektfunktion an, die aufgrund der räumlichen Ausdehnung der PSF in ein Bild umgewandelt wird. Das errechnete Bild wird mit dem gemessenen Bild verglichen und das Objekt neu abgeschätzt. Der Prozess wird sukzessive wiederholt, bis die im Algorithmus angenommene Objektfunktion $t(u, v)$ nach einer Faltung mit $h(u, v)$ das gemessene Bild $b(u, v)$ wiedergibt. Als Randbedingung kann man festhalten, dass die Objektfunktion positiv sein muss, $t(u, v) \geq 0$. Restaurationsverfahren dieser Art werden erst dann zuverlässig und effizient, wenn sowohl $h(u, v)$ als auch $b(u, v)$ mit adäquat hoher SNR gemessen ist. Darüber hinaus muss sichergestellt sein, dass die PSF während der Bildaufnahme translationsinvariant ist. Es gibt mittlerweile eine Reihe von Algorithmen, die sich aufgrund moderner und leistungsfähiger Rechner effizient einsetzen lassen. Einer davon ist der *Maximum-Likelihood-Estimation*-Algorithmus.

Restauriert man 4π -konfokale Bilder mit der PSF des 4π -konfokalen Mikroskops, $h_{2\text{phot-conf}}^{4\pi, A}$, so lassen sich tatsächlich dreidimensionale Fluoreszenzbilder von bisher unerreichter Schärfe erstellen. Abbildung 9.13 zeigt einen Vergleich einer zweiphotonenkonfokalen Aufnahme a mit der einer 4π -konfokalen mit anschließender Restauration mittels $h_{2\text{phot-conf}}^{4\pi, A}$ in b. Bei dem Objekt handelt es sich ebenfalls um willkürlich verteilte Fluoreszenzlatexpartikel von 100 nm Durchmesser. Die Bilder wurden im gleichen Objektbereich aufgenommen; der unmittelbare Vergleich zeigt eine fundamentale Erhöhung der Auflösung in der 3D-Lichtmikroskopie. Die effektive Auflösung liegt im Bereich von ca. 80–100 nm in axialer Richtung und ca. 120 nm in lateraler Richtung, bei einer Anregungswellenlänge von 810 nm und einer mittleren Fluoreszenzwellenlänge von 580–600 nm.

Abbildung 9.14 zeigt ein Anwendungsbeispiel in einer Mausfibroblastzelle. Dabei wurden Details aus mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Aktinfilamenten abgebildet: a zeigt das zweiphotonenkonfokale Bild, während b dessen 4π -konfokales Pendant nach einer Entfaltung durch die 4π -konfokale PSF. Wiederum ergibt der Vergleich eine deutliche Auflösungserhöhung zu gunsten des Letzteren.

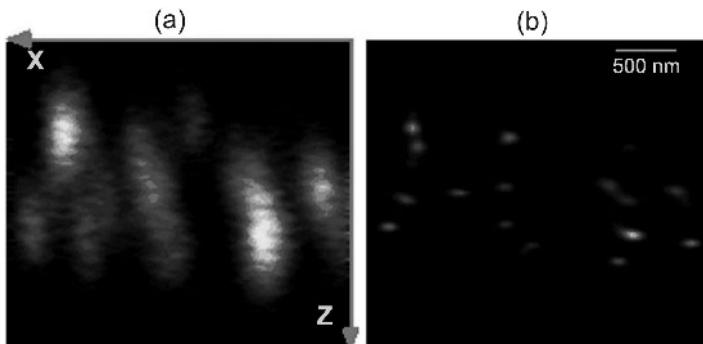


Abb. 9.13. Fluoreszierende Latexkügelchen aufgenommen mit einem Zweiphotonen (a) konfokalen und (b) 4π -konfokalen Rastermikroskop mit anschließender Restauration. In (b) erkennt man eine fundamentale Verbesserung der 3D-Auflösung mit Werten von 80–100 nm in axialer Richtung und ca. 120 nm in lateraler Richtung

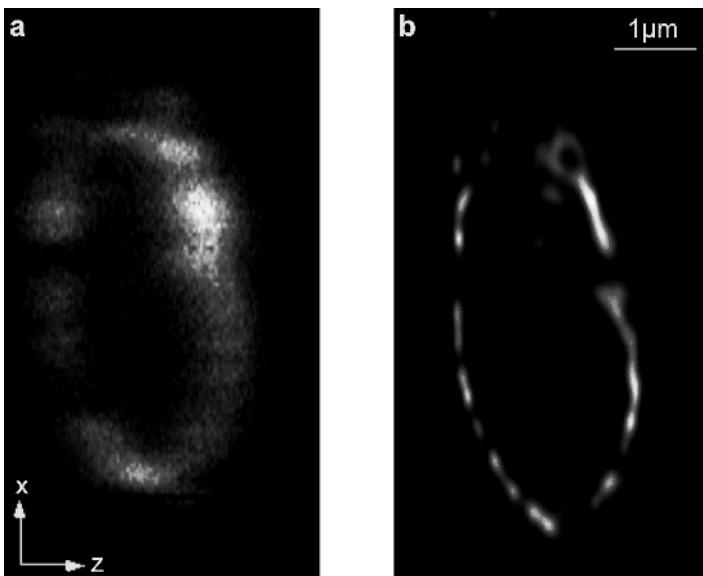


Abb. 9.14. Vergleich zwischen Detailstrukturen von fluoreszenzmarkiertem F-Aktin in einer Mausfibroblastzelle im Zweiphotonenfluoreszenzkontrast im (a) konfokalen und (b) 4π -konfokalen Mikroskop mit anschließender Restauration

Es ist aber auch möglich mit destruktiver Interferenz Entfaltungen durchzuführen. In diesem Fall erhält man statt Haupt- und Nebenmaxima zwei gleichwertige Hauptmaxima. Auch für diese PSF lässt sich in erster Näherung eine inverse Funktion D^{-1} finden, welche die beiden Hauptmaxima in ein einziges Maximum transformiert und somit eindeutige Bilder liefert. Es sei

hier nur am Rande bemerkt, dass man prinzipiell 4π -konfokale Mikroskopie mit beliebiger relativer Phase betreiben kann, es ist nur wichtig, dass man die relative Phase kennt. Leider kann man nicht erwarten, dass das immer der Fall ist. Schwankt die Phase aufgrund von starken Brechungsindexvariationen der Probe, so ist mit einer Phasenunsicherheit zu rechnen, welche diese Methode empfindlich einschränkt. Ein anderer Nachteil ist, dass bei Objektiven hoher Apertur der freie Arbeitsabstand zwischen Objektiv und Deckglas gering ist. Trotzdem hat die 4π -konfokale Mikroskopie ein hohes Potential, sich als ein leistungsfähiges, höchstauflösendes Fernfeldmikroskop zu etablieren. Mit Auflösungswerten im Bereich von $\lambda/5$ – $\lambda/10$ kommt sie der Auflösung der optischen Nahfeldmikroskopie sehr nahe. Im Gegensatz zu dieser besitzt sie aber die Fähigkeit zur dreidimensionalen Abbildung.

9.3.3 Höchstauflösung in lateraler Richtung: Neuere Konzepte

Spannender als die Auflösungserhöhung in axialer Richtung gestaltet sich die Auflösungsverbesserung in lateraler Richtung. War man über lange Zeit der Meinung, dass man aufgrund des Abbe-Beugungskriteriums an eine kaum zu überwindende Grenze angelangt sei, so lassen sich heute zumindest theoretisch leistungsfähige Konzepte aufstellen, die eine fundamentale Verbesserung der Auflösung in Aussicht stellen. Ebenso wie das 4π -konfokale Mikroskop beruhen sie auf der gezielten Veränderung der effektiven fokalen Ausdehnung in der Fluoreszenzmikroskopie. Man versucht durch die Kombination von photophysikalischen Effekten und optischer Anordnung eine räumlich schmälere effektive PSF zu erzielen. Ein solches Konzept ist das STED-Fluoreszenzmikroskop (engl. *Stimulated Emission Depletion Microscope*), mit dessen Hilfe man die laterale Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops theoretisch bis in den Bereich von 30–50 nm herunterführen kann.

Die Grundidee des STED-Fluoreszenzmikroskops ist, den effektiven Fokus zu verschmälern, indem die Moleküle im Randbereich des Fokus am Fluoreszieren gehindert werden. Dies soll dadurch erfolgen, dass man sie kurz nach der Anregung durch stimulierte Emission in den Grundzustand zwingt. Registriert man nur das Fluoreszenzlicht aus dem Innenbereich des Fokus, so ist nur der Teil des Fokus effektiv, in dem die Moleküle nicht in den Grundzustand gezwungen worden sind. Dabei kann man einen ringförmigen Laserstrahl benutzen, der auf den geometrischen Fokuspunkt des Anregungsstrahls zentriert ist. Um eine scharfe Abschneidekante zu erreichen, muss man allerdings die stimulierte Emission in die Sättigung treiben. Es sind gepulste Laser mit vergleichsweise hoher Spitzenintensität vonnöten. Eine weitere Herausforderung ist die Verringerung des Signals aufgrund immer kleinerer effektiver Foki sowie nicht perfekt scharfen Abschneidekanten des stimulierenden Strahls. Diesen Herausforderungen kann man prinzipiell durch ausgesuchte Farbstoffe mit geeigneter Photophysik begegnen.

Dem STED-Konzept ähnlich ist das Konzept der Grundzustandsentvölkerungsmikroskopie (engl. *Ground-State-Depletion Microscopy*, GSD). Hierbei werden die Moleküle am Randbereich des Fokus wiederum mit Hilfe eines ringförmigen Laserstrahls in den langlebigen Tripletzustand gepumpt, in welchem sie für eine kurze Zeit ($\approx 1\text{--}3\,\mu\text{s}$) dem Fluoreszenzprozess entzogen sind. In diesem Zeitintervall misst man die im Innenbereich des Fokus verbleibende Fluoreszenz. Sättigt man den Tripletzustand des Moleküls, so lässt sich laut Rechnung wiederum eine scharfe Abschneidekante erreichen, die effektive Ausdehnung der PSF reduzieren und prinzipiell die Abbe-Beugungsgrenze überwinden.

9.4 Zusammenfassung und Ausblick

Das STED- und das GSD-Konzept auch die 4π -konfokale Mikroskopie sind auf den ersten Blick unterschiedliche Verfahren. Es liegt ihnen aber eine gemeinsame Philosophie zu Grunde, nämlich in einem konfokalen oder Multiphotonenfluoreszenzrastermikroskop die räumliche Ausdehnung der effektiven Punktabbildungsfunktion (PSF) zu verringern. Diese effektive PSF wirkt als dreidimensionale Sonde, mit der man transparente Objekte in allen drei Raumrichtungen abbilden kann. Gelingt es durch geeignete Implementation von (photo-)physikalischen Prozessen, die räumliche Ausdehnung der effektiven PSF axial oder lateral zu reduzieren, so lässt sich die 3D-Auflösung erhöhen. Diesen Ansatz bezeichnet man als *Point-Spread-Function-Engineering*. Es ist wichtig sich klar zu machen, daß das Rastern ein essentieller Teil der Überwindung der Beugungsgrenze ist. Zwar könnte man durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer ‘zusammengeschränkter’ Foki das Verfahren parallelisieren, aber um das Rastern kommt man nicht herum.

Darüber hinaus kann man mit mathematischen Methoden die Auflösung noch weiter steigern. Mathematische Restaurationsalgorithmen werden nach Kombination mit räumlich schärferen effektiven PSF besonders leistungsfähig. Kombiniert mit mathematischen Entfaltungsalgorithmen wird das 4π -konfokale Mikroskop zur höchstauf lösendsten Form der fokussierenden Lichtmikroskopie. Die rasante Entwicklung in der Rechnerleistung lässt erwarten, dass sich gerade dieses Gebiet schnell entwickelt wird.

Zum ausgehenden 20. Jahrhundert – also mehr als hundert Jahre nach Abbes Erkenntnis – lässt sich feststellen, dass sich die 3D-Mikroskopie in einer stürmischen Entwicklung befindet. Zur Zeit ist die konfokale Einphotonen-Fluoreszenzmikroskopie das am meisten eingesetzte 3D-Verfahren. Seit Mitte der achtziger Jahre ist sie fast in jedes biologische Forschungslabor vorgedrungen. Die Multiphotonenmikroskopie ist eine neuere Entwicklung deren Stärke u. a. in der größeren Eindringtiefe in stark streuende Objekte ist. Die Dreidimensionalität der Abbildung erreicht man lediglich durch den nichtlinearen Charakter der Anregung. Multiphotonenmikroskopie ist eine sich sehr dynamisch entwickelnde, moderne Version der hochauflösenden Laserraster-

mikroskopie. In Kombination mit der 4Pi-konfokalen Mikroskopie erzielt man dreidimensionale Auflösungen, die noch vor ein paar Jahren kaum für möglich gehalten wurden.

Zur Zeit ist die konfokale Einphotonenfluoreszenzmikroskopie das am meisten eingesetzte 3D-Verfahren. Seit Mitte der 80er Jahre ist sie fast in jedes biologische Forschungslabor vorgedrungen. Die Multiphotonenmikroskopie ist eine neuere Entwicklung, deren Stärke u.a. in der größeren Eindringtiefe in stark streuende Objekte liegt. Die Dreidimensionalität der Abbildung erreicht man lediglich durch den nichtlinearen Charakter der Anregung. Multiphotonenmikroskopie ist eine sich sehr dynamisch entwickelnde, moderne Version der hochauflösenden Laserrastermikroskopie. In Kombination mit der 4π-konfokalen Mikroskopie erzielt man dreidimensionale Auflösungen, die noch vor ein paar Jahren kaum für möglich gehalten wurden.

Literatur

1. Denk W (1996) Two-photon excitation in functional biological imaging. *J Biomed Opt* 1:296–304
2. Hell SW (1997) Increasing the resolution of far-field fluorescence microscopy by point-spread-function engineering. In: Lakowicz JR (ed) *Topics in fluorescence microscopy*. Vol 5. Plenum Press, New York. pp. 361–426
3. Pawley J (ed) (1995) *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum, New York
4. Sheppard CJR, Shotton DM (1997) *Confocal laser scanning microscopy*. BIOS Scientific Publishers, Oxford
5. Xu C, Williams RM, Zipfel W, Webb WW (1996) Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores. *Bioimaging* 4(3):198–207

10 Flusszytometrie

M. Hausmann

In diesem Kapitel soll der Versuch unternommen werden, eine kurze Einführung und Übersicht zur Technik der Flusszytometrie, auch Durchflusszytometrie, Flussphotometrie oder Flow-Zytometrie genannt, zu geben. Wie der Name schon sagt, werden hierbei Eigenschaften von Zellen und Organellen in einem Flusssystem gemessen, das so konstruiert ist, dass es die Zellen einzeln durch das Analysevolumen führt und mit hoher Geschwindigkeit die simultane Detektion einer Kombination von Eigenschaften ermöglicht. Typischerweise können bis zu 8 optische Parameter von bis zu 10 000 Partikeln pro Sekunde gemessen werden. Moderne immunochemische Markierungsmethoden erlauben die spezifische Markierung einer Vielzahl von Zelleigenschaften, die dank leistungsstarker schneller Computer in einigen 10–199 ms den Status einer Zelle bestimmen. Zusätzlich besteht die Option, einzelne Partikel nach einem vorgegebenen Parameterspektrum mit hoher Reinheit zu sortieren.

In den letzten 20 Jahren entwickelte sich diese Technik zum Routineverfahren in vielen Bereichen der biologischen Forschung und klinischen Diagnostik, insbesondere in der Immunologie und Hämatologie. Darüber hinaus entdecken immer neue Anwendungsbereiche, wie z.B. die Umweltanalytik, das Potential der Flusszytometrie. Eine umfassende Übersicht über die vielfältigen Variationen der Geräte und insbesondere der Anwendungen zu geben, würde angesichts der in den letzten Jahren exponentiell angestiegenen Zahl an Publikationen den Rahmen dieses Buches sprengen. Da der Markt von Flusszytometern durch zwei amerikanische Firmen, Becton-Dickinson und Beckmann Coulter (vorm. Coulter Electronics), dominiert wird, soll nachfolgend im Wesentlichen die Basistechnologie der triaxialen orthogonalen Analysesysteme und der Tröpfchensorter behandelt werden, wie sie in deren Geräten hauptsächlich Verwendung findet. Für eine genauere Beschreibung der axialen Anordnung mit geschlossenem Flusssystem, bei dem zur Sortierung der Flüssigkeitsstrom kurzzeitig abgelenkt wird und das in erster Linie die Firma Partec verfolgt, sei auf die Literatur verwiesen (z.B. [11]). Ebenso befindet sich am Ende dieses Kapitels eine Übersicht von Büchern, die sowohl die physikalische Technik als auch die Anwendungen umfassend beschreiben und eine Vielzahl von Primärliteratur zur gesamten Flusszytometrie liefern.

10.1 Historie

Das erste Gerät zur Analyse von Zellen, das ein Flusssystem als Träger benutzte, wurde 1934 von Moldavan vorgestellt [21]. Dabei wurden in erster Linie Blutzellen piezoelektrisch gezählt. Das Flusssystem, das mit dünnen Kapillaren arbeitete, hatte jedoch noch erhebliche Probleme durch die Aggregation von Partikeln. Dieses Problem wurde durch Verwendung einer Hüllstromflüssigkeit, d.h. eines laminar strömenden Flüssigkeitsmantels, der den Partikelstrom umgab, Anfang der 50er Jahre gelöst [6]. Gegenüber einer Glaskapillare mit harten Wänden ist eine solche „Flüssigkeitskapillare“ elastisch und daher weniger empfindlich gegen einen Verschluss durch Aggregation der Zellen. Dieses Prinzip wird heute in allen Flusszytometern genutzt.

Ebenfalls Anfangs der 50er Jahre publizierte Coulter eine Methode, durch Messung der elektrischen Charakteristik (Widerstandsänderung) einer Öffnung beim Durchströmen mit einer Zellsuspension in einer leitenden Flüssigkeit die Größe einer Zelle zu bestimmen. Diese Entwicklung führte zum sog. „Coulter-Counter“ [4]. Als einzige nichtoptische Analysetechnik in der Flusszytometrie findet diese Technik heute breite Anwendung, insbesondere in der hämatologischen Diagnostik und Forschung.

Mitte der 60er Jahre führten Kamentsky und Mitarbeiter mit Hilfe von Spektrometern zum ersten Mal quantitative Messungen an Zellkonstituenten in einem Zweiparameterflusszytometer durch, bei dem Optik und Probenstrom orthogonal angeordnet waren. Bis zu 500 Zellen pro Sekunde konnten analysiert werden [16]. Zur gleichen Zeit entwickelte Sweet einen High-Speed-Oszillograph, der mit geladenen Tintenropfchen schrieb [31]. Nach dem Prinzip dieses Tintenstrahldruckers baute Fulwyler den ersten Zellsorter [9].

Ende der 60er Jahre setzte sich in der biologischen Forschung die Fluoreszenzfärbung gegenüber der bisher genutzten Absorptionsfärbung durch. Das erste triaxiale, orthogonale Analysesystem, bei dem Probenstrom, Lichtstrahl und die optische Achse des Detektionssystems zueinander senkrecht stehen, wurde in Los Alamos, USA, gebaut [33]. Erstmals kam hierbei ein Argon-Ionen-Laser als Lichtquelle zum Einsatz.

Aus all diesen Einzelentwicklungen entstand schließlich ein Tröpfchensorter zur Analyse und Sortierung von Zellen nach Fluoreszenz- und Streulichtparametern, der als „Urvater“ der heutigen Flusszytometer anzusehen ist [3, 14, 15]. Prinzipielle Änderungen dieses Systems nach Hulett und Bonner sind bis heute praktisch nicht mehr vorgenommen worden. Es wurden lediglich die Detektionskanäle für die simultane Detektion von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen und die Zahl der Laseranregungslichtquellen erhöht [1, 8, 17, 29].

Mit Verbesserung der Sensitivität und Fluoreszenzausbeute der zur Verfügung stehenden Fluorochrome wurde es möglich, kleinere Laser (z.B. luftgekühlte Argon-Ionen- oder HeNe-Laser) einzusetzen, und so kompaktere Laborgeräte zu bauen. Schnellere Detektionselektronik und leistungsfähigere

Computer erlaubten eine Erhöhung des Durchsatzes an Probenmaterial und gleichzeitig eine Miniaturisierung der Geräte. So bieten die relevanten Firmen heute Geräte vom vollautomatischen Kompaktgerät, das für die Analyse bestimmter Fluorochrome und Antikörper im immunologischen Routinelebör optimiert ist, bis hin zum flexiblen Multilaser-Multiparameter-Hochleistungssorter für jede Art der biologischen und klinischen Forschung. Der Nutzer kann aus einem breiten Spektrum von Analysatoren und Sortern die für seine Applikation optimierte Version auswählen. Umfangreiche Software erlaubt es, auch große Datenmengen hinsichtlich einer Vielzahl von Parametern zu analysieren und dem Nutzer graphisch, quantitativ darzustellen. Für die Diagnostik optimierte Systeme liefern dem Mediziner alle Daten in einer für eine schnelle Diagnose bestmöglichen Darstellung.

10.2 Allgemeiner Aufbau und Prinzip eines Flusszytometers

Der allgemeine Aufbau und der Ablauf einer Messung lässt sich anhand von Abb. 10.1 beschreiben: Die Zellen oder subzelluläre Partikel, z.B. Zellkerne, Organellen, Chromosomen etc., müssen zunächst aus ihrem jeweiligen Verband isoliert und in Suspension gebracht werden. Hierin muss auch eine eventuelle Fluoreszenzfärbung, entweder direkt mit geeigneten spezifischen Fluorochromen oder indirekt über Fluorochromantikörperkomplexe erfolgen.

Anschließend wird die Probensuspension vom System angesaugt und/oder durch ein entsprechendes Drucksystem in den laminaren Strom der meist elektrisch leitenden Hülstromflüssigkeit (z.B. NaCl-Lösung oder PBS) eines Düsensystems (Flusszelle) injiziert. Die Flusszelle ist so gebaut, dass der Hülstrom den Probenstrom hydrodynamisch auf einen Durchmesser in der Größenordnung von typisch $10\text{ }\mu\text{m}$ fokussiert, sodass die Partikel einzeln nacheinander den Analysepunkt durchqueren. Der fokussierte Flüssigkeitsstrom durchquert den Analysepunkt entweder in einer rechteckigen Quarzküvette oder, nach Verlassen der Flusszelle durch eine Düse, als freier Flüssigkeitsstrahl („Jet-in-Air“). Die Quarzküvette hat typischerweise eine Kantenlänge von $200\text{--}250\text{ }\mu\text{m}$ und wird meist in den reinen Analysegeräten eingesetzt. Sie erlaubt auch geringere Flussgeschwindigkeiten von $1\text{--}2\text{ m/s}$. Dagegen werden für Tröpfchensorter meist keine Küvettensysteme eingesetzt (Ausnahme: die früher von Ortho Diagnostics produzierten Geräte).

„Jet-in-Air“-Systeme arbeiten mit Flussgeschwindigkeiten von typisch 10 m/s . Der Jet wird durch eine Düse am Auslass der Flusszelle (meist durch einen Uhr-Lagerstein hergestellt) auf $50\text{--}150\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser fokussiert. Zur Herstellung der Tröpfchen wird die Flusszelle durch einen Piezokristall in Schwingungen in Richtung des Flüssigkeitsstrahl versetzt. Bei fester Flussgeschwindigkeit und gegebener Piezofrequenz von typischerweise $30\text{--}40\text{ kHz}$ reißt der Flüssigkeitsstrahl an einer definierten Stelle ca. 5 mm unterhalb des Analysepunkts tropfenweise ab.

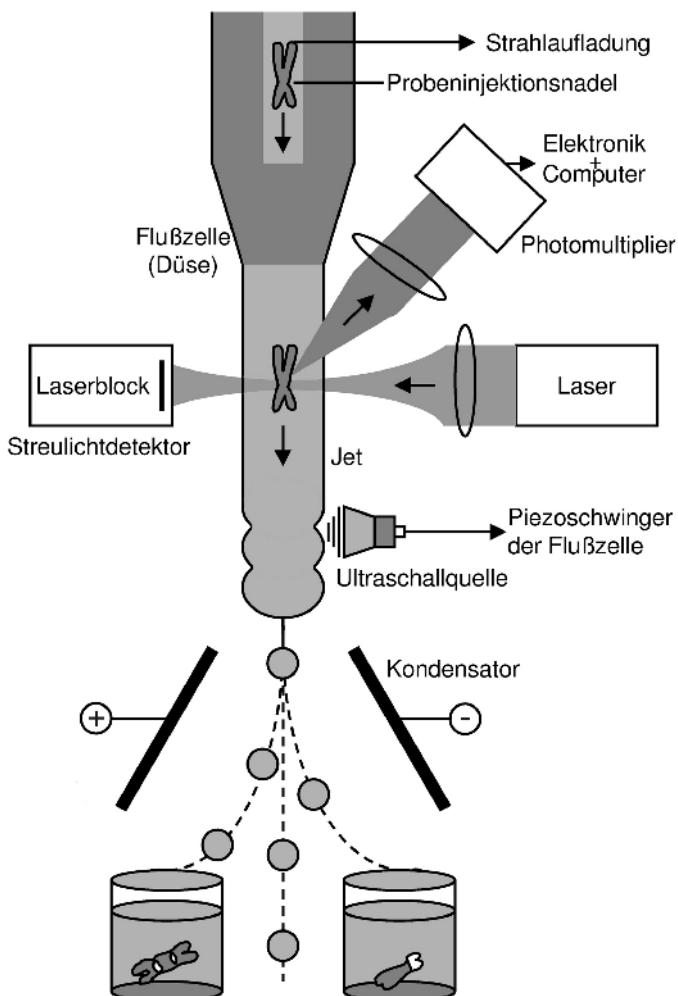


Abb. 10.1. Prinzip eines Flusszytometers zur Sortierung von Biopartikeln („Jet-in-Air“-System). Dargestellt ist die Modifikation mit hochfokussiertem Laser für Slit-Scanning von Chromosomen (s. Kap. 10.5.). Bei Routinegeräten ist im Gegensatz zu Slit-Scan-Sortern der Laserfokus breiter als die Länge der zu analysierenden Partikel (s. Kap. 10.3.2)

Für die Analyse werden ein oder mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge auf den Partikelstrahl fokussiert. Gemessen werden simultan Vorfärtsstreulicht in einem Winkel von etwa 5–20°, Seitwärtsstreulicht um 90° und typischerweise bis zu 6 Fluoreszenzparameter (abhängig von der Zahl der zur Verfügung stehenden Photomultiplier). Neueste Entwicklungen, die Energietransfereffekte geeigneter Fluorochrome ausnutzen, erlauben die simul-

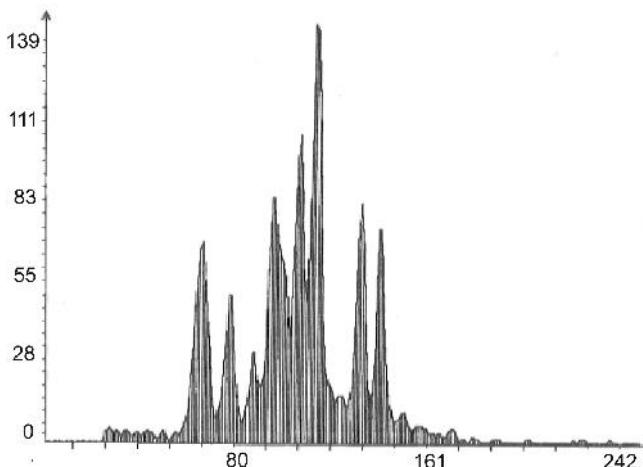


Abb. 10.2. Beispiel einer flusszytometrischen Messung: Dargestellt ist die Häufigkeit von Fluoreszenzsignalen gegen die relative Fluoreszenzintensität von Partikeln einer Chromosomensuspension nach Färbung mit DAPI Flusskaryotyp

tane Detektion von mehreren Fluoreszenzparametern, wobei nur eine Laserlinie zur Anregung genutzt wird. Von den pro Partikel gemessenen Signalen können Pulshöhe, Halbwertsbreite oder Pulsfläche bestimmt und, logarithmisch oder linear verstärkt, vom Computer in Form eines Wertes eines Häufigkeitshistogramms dargestellt werden (Abb. 10.2). Bei mehreren simultan gemessenen Parametern können die Parameter in beliebiger Kombination in Form von zweidimensionalen Histogrammen („dot-plot“) oder pseudodreidimensionalen Verteilungen dargestellt werden. Aus diesen Histogrammen werden die jeweiligen Sortierfenster per Software festgelegt.

Neben den optischen Parametern kann bei manchen Geräten auch noch die Änderung des elektrischen Widerstands beim Durchgang der Zelle durch die Düse gemessen werden (Coulter-Volumen). Meist sind jedoch Coulter-Counter eigenständige, reine Analysegeräte, die im Gegensatz zu Flusszytometern keine optischen Messungen oder Sortierungen zulassen.

Pro Messung können im Flusszytometer jeweils simultan zwei Subpopulationen sortiert werden. Dazu werden die Tröpfchen, bevor sie sich vom Flüssigkeitsstrahl trennen, dann elektrisch positiv oder negativ über den Hüllstrom mit einem Spannungspuls von ca. ± 100 V aufgeladen, wenn das analysierte Partikel die entsprechenden Werte in dem zuvor festgelegten Parameterfenster erfüllt. Im Schnitt trägt nur jedes zehnte Tröpfchen ein Partikel. Häufig werden zur sicheren Trennung 3–5 Tröpfchen pro Sortierpuls geladen. Die Tröpfchen fliegen schließlich durch ein Kondensatorfeld von einigen kV Potentialdifferenz (typisch ± 2 kV), worin die geladenen Tröpfchen in entsprechende Sortiergefäße, auf Nitrozellulosefilter oder auf Objekträger für die Mikroskopie sortiert werden.

Während reine Analysatoren heute Partikelraten von bis zu 10 000 Partikeln pro Sekunde detektieren und verarbeiten können, sind die Sortierraten i. Allg. geringer. Abhängig vom Sortergut und der geforderten Reinheit (meist größer als 90%; technisch über 99% machbar) sind in der Praxis Partikelraten von einigen 100 bis zu 1000/s üblich.

10.3 Technische Aspekte

10.3.1 Lichtquellen

Als Lichtquellen können Bogenlampen (Xe, Hg) genutzt werden. Allerdings spielen sie heute kaum noch eine Rolle. Laserlichtquellen werden aufgrund ihrer Monochromasie und hohen Fokussierbarkeit bevorzugt. Dabei findet der Argon-Ionen-Laser mit seinen Hauptlinien bei 488 nm und 514 nm die stärkste Verbreitung. Insbesondere die Linie bei 488 nm eignet sich für die Anregung von Fluorescein und Phycoerythrin, zwei für die Antikörpermarkierung in der Immunologie häufig verwendete Fluorochrome. Luftgekühlte Laser von teilweise nur 15 mW Leistung werden hier in Routinegeräten eingesetzt. Daneben werden größere (wassergekühlte) Argon-Ionen-Laser verwendet, die z.B. auch die Linie bei 458 nm und die UV Linien zwischen 333 nm und 363 nm mit entsprechender Intensität liefern.

Ergänzt wird das Linienspektrum des Argon-Ionen-Lasers durch den Krypton-Ionen-Laser mit Linien beispielsweise bei 530, 568 oder 647 nm. Für Streulichtmessungen sowie für Farbstoffe, die bereits bei wenigen mW Leistung eine hohe Fluoreszenzintensität zeigen, werden HeNe-Laser bei 633 nm und 543 nm verwendet. Schließlich werden noch Argon-Ionen- oder Krypton-Ionen-Laser-gepumpte Farbstofflaser sowie verstärkt luftgekühlte Helium-Cadmium-Laser verwendet, die bei einer Wellenlänge von 325 nm bis zu 10 mW Leistung liefern.

10.3.2 Anregungsoptik

Die Größe des Laserfokus lässt sich mit Hilfe der Optik Gauß-förmiger Strahlen bestimmen. Dabei wird die Ausdehnung des Laserstrahls durch den jeweiligen Abstand der $1/e^2$ -Intensitätspunkte des Gauß-förmigen Strahlprofils gegeben. Typischerweise werden die Laserstrahlen in Flusszytometern auf einen elliptischen Fokus von 20–50 μm Durchmesser in Richtung des Partikelstroms und 80–150 μm senkrecht dazu. Dies gewährleistet trotz der inhomogenen Intensitätsverteilung des Laserstrahls um den Fokus herum auch bei geringen Leistungen eine Fluoreszenzanregung im Sättigungsreich des Fluorochroms für alle möglichen Partikeltrajektorien innerhalb des Flüssigkeitsstrahls.

Die einfachste Form einer Fokussieroptik wird durch eine Kombination von zwei gekreuzten Zylinderlinsen unterschiedlicher Brechkraft realisiert,

wobei die horizontale und vertikale Fokussierung zunächst unabhängig von einander betrachtet werden können.

Für die Berechnung soll die Näherung dünner, unendlich ausgedehnter sphärischer Linsen angenommen werden, was bei einem Linsendurchmesser $D \geq 1,7d$ (d = Strahldurchmesser des Laserstrahls) als erfüllt anzusehen ist. Die Lösung der Wellengleichung

$$\Delta u + k^2 u = 0,$$

mit u = elektrische Feldstärke und $k = 2\pi/\lambda$ (λ = Wellenlänge) ergibt für einen Laser im reinen TEM₀₀-Mode:

$$u(r, z) = c \frac{w_0}{w(z)} \exp\left(\frac{-r^2}{w(z)^2}\right) \exp\left[-i\left(\frac{kr^2}{2R(z)} + kz\right) - i\Phi\right],$$

c = Konstante, $w_0 = w(0)$ = Strahlende (0 kleinster Strahlradius), $w(z)$ = Strahlradius, definiert als den $1/e$ -Abfall der Amplitude der Feldstärke senkrecht zur Ausbreitungsrichtung, z , r = radialer Abstand von der Strahlmitte, $R(z)$ = Radius der Flächen konstanter Phase (Wellenfronten),

$$\Phi = \arctan\left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2}\right).$$

Φ ist eine langsam sich mit z ändernde Größe, die die Phasenshift zwischen ebener Wellenfront und Gauß-förmigem Laserstrahl beschreibt ($\Phi(0) = 0$; $\Phi(z \rightarrow \infty) = \pi/2$).

Strahlradius und Krümmungsradius lassen sich schreiben als

$$w(z) = w_0 \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2}$$

$$R(z) = z \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{z_R}{z}\right)}, \quad (R(0) = \infty; R(z \rightarrow \infty) = z),$$

wobei $z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$ die sog. Rayleigh-Länge ist, bei der die Wellenfrontkrümmung ihr Minimum durchläuft. Die Intensität eines Laserstrahls ergibt ebenfalls wieder eine Gauß-Funktion

$$I(r, z) \sim \left(\frac{w_0}{w(z)}\right)^2 \exp\left(\frac{-2r^2}{w(z)^2}\right),$$

wobei für $r = w(z)$ die Intensität auf $1/e^2$ der maximalen Intensität bei z abgefallen ist.

Ein Gauß-Strahl divergiert also stets von der Strahlende aus. Für $z \gg z_R$ lässt sich die Divergenz als Asymptote zum hyperbelförmigen Strahlrand (Abb. 10.3) beschreiben:

$$\beta = \frac{\lambda}{\pi w_0}.$$

Die Strahlende beschreibt den Fokussdurchmesser. Je kleiner diese ist, desto stärker divergiert ein Laserstrahl. Definiert man als Fokustiefe A den

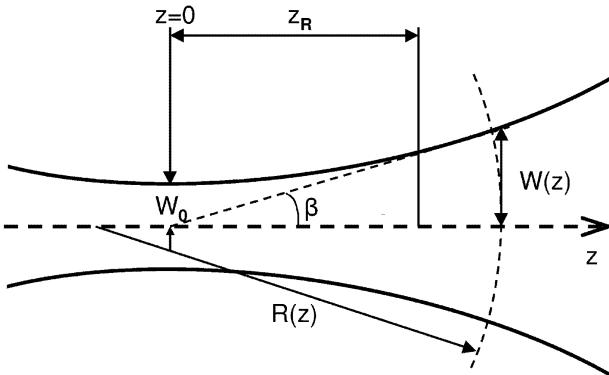


Abb. 10.3. Divergenz eines Gauß-förmigen Laserstrahls

Strahlbereich einer 10% Aufweitung, so lässt sich diese schreiben als

$$2z(w = 1,1w_0) = A = 0.917z_R = 2.88 \frac{w_0^2}{\lambda}.$$

Für die Fokussierung Gauß-Strahlen durch eine unendlich ausgedehnte ideale Linse gilt, dass ein Gauß-Strahl wiederum in einen Gauß-Strahl transformiert und eine Strahltaille w_{01} in eine Strahltaille w_{02} abgebildet wird. Abbildung 10.4 stellt dies schematisch dar; dabei sei Z_1 die Gegenstands- und Z_2 die Bildweite.

Mit Hilfe der Linsentransformationsfunktion

$$T = \exp \left(-i \frac{kr^2}{2f} \right),$$

f = Brennweite, ergibt die Fresnel-Transformation:

$$Z_2 = f + \frac{f^2(Z_1 - f)}{(Z_1 - f)^2 + z_{R1}^2}$$

$$w_{02} = w_{01} \sqrt{\frac{f^2}{(Z_1 - f)^2 + z_{R1}^2}}.$$

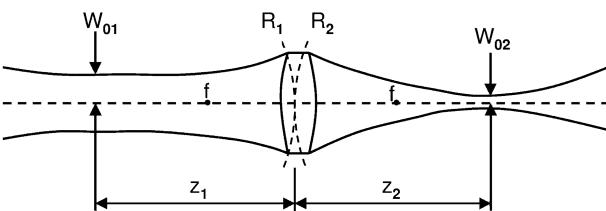


Abb. 10.4. Fokussierung eines Gauß-förmigen Strahls an einer idealen, dünnen Linse

10.3.3 Detektionsoptik

Für die Detektion von Fluoreszenz- und Seitwärtsstreuulicht sollte die Sammelloptik eine möglichst hohe numerische Apertur besitzen, um einen möglichst hohen Anteil des Lichts zu registrieren. In einigen Flusszytometern hat man dazu auf der zur Sammellinse gegenüber liegenden Seite des Flusssystems einen sphärischen Spiegel montiert, dessen Fokalpunkt im Schnittpunkt von Anregungslaserstrahl und Probenstrom liegt. Im Fall von Vorwärtsstreuulicht besteht dieses Empfindlichkeitsproblem nicht. Hier ist nur darauf zu achten, dass der primäre Laserstrahl ausgeblendet wird. Die Detektion erfolgt mit einer Photodiode.

Streulichtmessungen werden als Diskriminationsparameter nach Größe und Gestalt herangezogen. Für Partikel kleiner als die Wellenlänge wird die Steuung durch die Rayleigh-Theorie, für größere Partikel durch die Mie-Theorie beschrieben, die eine exakte Lösung der Maxwell-Gleichungen für homogene, kugelförmige Partikel darstellt.

Im Fall inhomogener, nicht kugelförmiger Partikel, wie sie Zellen oder andere biologische Proben bieten, ist man auf Näherungen angewiesen wie z.B. die Rayleigh-Gans-Approximation oder andere komplexe numerische Näherungen, die heute mit leistungsfähigen Computern berechnet werden können. Da all diese Ansätze den Rahmen dieses Kapitels übersteigen, sei an dieser Stelle auf Kap. 5 des Lehrbuches von Melamed et al. verwiesen, sodass ich mich auf eine kurze, mehr intuitive Beschreibung beschränken kann.

Man stelle sich die Oberfläche eines Partikels aus einer Reihe kleiner Dipole zusammengesetzt vor, die von der anregenden Lichtquelle in Schwingungen versetzt werden. Das Streulicht setzt sich dann aus den Einzelwellen von diesen Dipolen zusammen. Da die Dipole alle in Phase angeregt werden und einen festen räumlichen Abstand zueinander haben, hängt die Intensität des gestreuten Lichts von der Interferenz der Einzelwellen und deren relativen Phasenbeziehung ab.

Zur Vereinfachung und ohne Beschränkung der Allgemeinheit seien die Dipole in einer Reihe senkrecht zum anregenden Lichtstrahl mit festen Abständen zueinander angeordnet. In Vorwärtsrichtung sind somit alle Dipole in Phase. Die Intensität des Verwärtsstreuulichts ist damit proportional zum Quadrat der Gesamtzahl der Dipole. Für die Praxis ist das Vorwärtsstreuulicht damit stark von der Größe der Partikel abhängig.

Nimmt man nun weiter an, dass das Maximum der Abstände der Dipole in der Größe von etwa der halben Wellenlänge des anregenden Lichts sein kann, so können beim Seitwärtsstreuulicht einige Wellenzüge destruktiv interferieren. Wird das gemessene Partikel nun größer, ohne die Regelmäßigkeit seiner Form (hier lineare Anordnung der Dipole) zu ändern, so erhöht sich die Zahl der destruktiven Interferenzen. Die Intensität des Seitwärtsstreuulichts verändert sich nur unwesentlich. Verändert man aber die Anordnung der Dipole, d.h. die Form der zu messenden Partikel, so können die destruktiven Interferenzen verschwinden, und die Streulichtintensität ändert sich.

Aufgrund dieser einfachen Darstellung wird klar, dass Vorwärtsstreulicht ein relativer Größenparameter, während Seitwärtsstreulicht eher ein relativer Formparameter ist. Streulichtparameter werden daher meistens auch eingesetzt, um bei spezifischen Fluoreszenzmarkern Zellen von Debris (Zellbruchstücken etc.) zu diskriminieren.

Fluoreszenzmessungen liefern bei den meisten biologischen Objekten die wesentliche Information. Eine Vielzahl von Farbstoffen und insbesondere Farbstoffantikörperkomplexen unterschiedlicher Spezifität stehen heute dem Nutzer kommerziell zur Verfügung. Je nach Ausrüstung verfügen Flusszytometer über 2–6 Photomultiplier teilweise unterschiedlicher spektraler Empfindlichkeit. Diese Photomultiplier werden entlang des Detektionsstrahlengangs angeordnet, der senkrecht zum Probenstrahl und zum anregenden Laserstrahl steht. Neben Seitwärtsstreulicht können so bis zu fünf Fluoreszenzfarben simultan detektiert werden. Prinzipiell kann die Zahl der Detektoren jedoch auch höher sein. Dabei müssen die Detektionskanäle durch eine geeignete Kombination optischer Filter spektral separiert werden. Zur Verfügung stehen:

1. Bandpassfilter (bp), deren Transmissionsspektrum durch die Halbwertsbreite um die Maximalwellenlänge gegeben ist;
2. (dichroitische) Langpassfilter (lp), die oberhalb eines bestimmten Wellenlängenwertes (gegeben durch den 50% Kantenwert) transmittieren;
3. (dichroitische) Kurzpassfilter (kp), die unterhalb eines bestimmten Wellenlängenwertes (gegeben durch den 50% Kantenwert) transmittieren.

Dabei nutzt man aus, dass verschiedene Fluorochrome mit derselben Laserwellenlänge angeregt werden können, sich jedoch in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden. Hierzu eignen sich besonders kombinatorische Farbstoffkonjugate, wie z.B. Phycoerythrin/Texas Red oder Phycoerythrin/Cyanin 5, bei denen der erste Farbstoff absorbiert und über direkten Energietransfer den zweiten zur Fluoreszenzemission anregt. In Tabelle 10.1 soll für die nacheinander folgende Anordnung der Detektionskanäle ein Beispiel gegeben werden.

Tabelle 10.1. Anregung bei 488 nm (Argon-Ionen-Laser)

Detektionskanal 1:	Dichroit 500 nm lp + 488/10 nm bp für Streulicht
Detektionskanal 2:	Dichroit 560 nm lp + 530/30 nm bp für Fluorescein Fluoreszenz
Detektionskanal 3:	Dichroit 600 nm lp + 580/30 nm bp für Phycoerythrin Fluoreszenz
Detektionskanal 4:	Dichroit 640 nm lp + 620/30 nm bp für Phycoerythrin/Texas Red Fluoreszenz
Detektionskanal 5:	660 nm lp für Phycoerythrin/Cyanin 5 Fluoreszenz

In jüngster Zeit wurde eine Vielzahl neuer Fluorochrome entwickelt, die ein breites Spektrum für kombinatorische Färbung bilden und für die klinische Routine bereits an Antikörper gekoppelt „ready to use“ geliefert werden.

10.3.4 Hydrodynamik von „Jet-in-Air“-Tröpfchensortern

Während man bei Küvetten von einer laminaren Strömung mit einem vollständig ausgebildeten paraboloiden Strömungsprofil ausgehen kann, welches dem Hagen-Poiseulle-Gesetz folgt, sind „Jet-in-Air“-Systeme hydrodynamisch komplexer und verfügen über verschiedene variable Parameter, die die Sortierung beeinflussen können. Daher sollen einige physikalische Aspekte hierzu am konkreten Beispiel einer typischen Flussdüse dargestellt werden.

Die Abhängigkeit der Flussgeschwindigkeit vom Hüllstromdruck p lässt sich durch die Bernoulli-Gleichung abschätzen:

$$p = \frac{\rho}{2} (\bar{v}_1^2 - \bar{v}_2^2) ,$$

\bar{v}_2 = mittlere Hüllstromgeschwindigkeit, \bar{v}_1 = mittlere Jetgeschwindigkeit, ρ Dichte der Hüllstromflüssigkeit.

Durch die hydrodynamische Fokussierung in der Düse gilt

$$\bar{v}_{\text{jet}} \gg \bar{v}_{\text{Hüllstrom}} ,$$

sodass

$$\bar{v}_{\text{jet}} = \sqrt{\frac{2p}{\rho}}$$

wird. Mit der Annahme von Wasser als Hüllstrom und der Druckangabe in [psi] (1 psi = $6,89 \cdot 10^3$ Pa; typisch für amerikanische Geräte) gilt

$$\bar{v}_{\text{jet}} = 3,7\sqrt{p} \left[\frac{m}{s} \right] .$$

Bei einer Düsenöffnung von z.B. $84 \mu\text{m}$ Durchmesser und einer mittleren Geschwindigkeit \bar{v} von 10 m/s am Düsenausgang ergibt sich für Wasser bei Raumtemperatur eine Reynolds-Zahl

$$\text{Re} = \frac{d\rho\bar{v}}{\eta} = 840 ,$$

(d = Düsendurchmesser; ρ = Dichte; η = dynamische Viskosität), d.h. die Bedingungen für laminare Strömung ($\text{Re} \leq 2000$) sind erfüllt.

Die zylindrische Öffnung des Lagersteins formiert einen Flüssigkeitsstrahl von $76 \mu\text{m}$ Durchmesser. Benutzt man für eine Rohrströmung das Gesetz von Hagen-Poiseulle und eine Reibungskraft

$$F = 2\pi rl\eta dv/dr ,$$

(r = Abstand von Rohrmitte; l = Länge des Rohrs; η = dynamische Viskosität; dv/dr = Geschwindigkeitsgradient der Flüssigkeit), so lässt sich

$$v(r) = 2\bar{v} \cdot \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right)$$

(\bar{v} = mittlere Geschwindigkeit; R = Rohrradius) für ein vollständig ausgebildetes parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil bestimmen. Der Lagerstein habe eine Dicke von $470\text{ }\mu\text{m}$. Nach [32] entwickelt sich ein parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil in einer Röhre gemäß

$$x = \frac{1}{4} \left[-0,169 + \frac{0,718}{\bar{v}/v_M} + 1,268 \cdot \ln \left(\frac{\bar{v}}{v_M} \right) - 0,550 \left(\frac{\bar{v}}{v_M} \right) \right] \cdot d \cdot \text{Re},$$

x = Abstand vom Rohreinlass, d = Rohrdurchmesser, Re = Reynold-Zahl, \bar{v}/v_M = mittlere/maximale Flussgeschwindigkeit mit $0 < v_M/\bar{v} \leq 2$.

Für $v_M/\bar{v} = 2$ hat sich die Parabel voll ausgebildet. Dies entspräche für $d = 84\text{ }\mu\text{m}$ und $R = 840$ einer Strecke $x = 2,0\text{ mm}$. Bei $470\text{ }\mu\text{m}$ ist $v_M/\bar{v} \approx 1,5$; d.h. die Parabel hat sich an den Seiten bis zu etwa $R/2$ ausgebildet. Für den Flüssigkeitsstrahl am Düsenaustritt ist damit um einen zentralen Bereich von ca. $35\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser die Geschwindigkeit konstant.

Nach Austritt aus der Düse werden die äußeren Flüssigkeitsschichten beschleunigt und die inneren abgebremst, da die Reibung an den Rohrwänden wegfällt. Der Jet verjüngt sich aufgrund der Impulserhaltung, und es stellt sich eine konstante Geschwindigkeit über den Jetquerschnitt ein. Mit M , dem Impuls pro Zeit, und dm , einem pro Zeit strömenden Massenelement, ergibt sich

$$M = \int_0^R v(r) dm = \int_0^R \rho v(r) 2\pi r dr.$$

Für eine im Rohr vollständig ausgebildete Geschwindigkeitsparabel wird

$$M = \frac{\pi}{3} d_R^2 \bar{v}_R^2 \rho$$

(d_R = Rohrdurchmesser; \bar{v}_R = mittlere Geschwindigkeit im Rohr) und für eine konstante Jetgeschwindigkeit wird

$$M = \frac{\pi}{4} d_{\text{jet}}^2 \bar{v}_{\text{jet}}^2 \rho.$$

Damit wird

$$d_{\text{jet}} = \frac{\sqrt{3}}{2} d_R.$$

Zur Tröpfchenbildung wird die Düse mit einem Piezokristall gekoppelt und zu Schwingungen in Richtung des Flüssigkeitsstrahls angeregt. Die Bewegung der Düse deformiert die inkompressible Flüssigkeit, wobei potentielle Energie in der Oberflächenspannung gespeichert wird. Im Bezugssystem des

Flüssigkeitsstrahls bildet sich eine exponentiell anwachsende, stehende Welle aus. Die Abschnürung des Strahls findet zwischen zwei Amplitudenmaxima im Abstand der Wellenlänge an definierter Stelle statt. Das so abgetrennte Flüssigkeitselement nimmt idealerweise die energetisch günstige Kugelform an.

Die Tröpfchenbildung von zylindrischen Flüssigkeitssäulen wurde theoretisch erstmals von Lord Rayleigh [26, 27] behandelt. Aufbauend auf Versuchen von [12] werden bei [36] theoretische Untersuchungen zum Zerfall eines nichtzähnen und zähnen Flüssigkeitsstrahls mit und ohne äußere Luftkräfte untersucht. Weitere Experimente zum Tröpfchenabriß findet man bei Merrington und [20] sowie zum Einfluss von großen Partikeln auf den Tröpfchenabriß bei [30]. Im Folgenden sollen kurz die wesentlichen Punkte zusammengefasst werden [36].

Auf einen Flüssigkeitszylinder von Radius a wirke die Oberflächenspannung α und der relative Druck $p = \alpha/a$ (Abb. 10.5). Eine Auslenkung δ ändere den Druck um Δp :

$$p + \Delta p = \alpha \left(\frac{1}{a_1} + \frac{1}{a_2} \right),$$

mit

$$\frac{1}{a_1} = -\frac{\partial^2 \delta}{\partial x^2} \quad \text{und} \quad \frac{1}{a_2} = \frac{1}{a} - \frac{\delta}{a^2} - \frac{1}{a^2} \frac{\partial^2 \delta}{\partial \phi^2}$$

(für $a_2 = a + \delta$, $\delta < a$) (Annahme: Zylinderkoordinaten x, ϕ und nach außen gewölbt (negatives Vorzeichen)).

$$\frac{\partial^2 \delta}{\partial \phi^2} = 0$$

für rotationssymmetrische Auslenkung. Damit wird

$$\Delta p = -\alpha \left(\frac{\partial^2 \delta}{\partial x^2} + \frac{\delta}{a^2} \right).$$

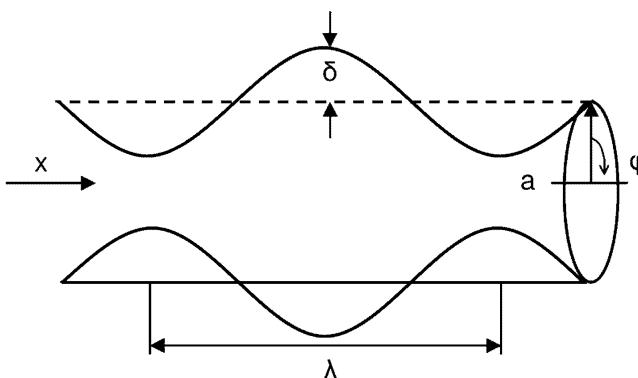


Abb. 10.5. Veranschaulichung der Tröpfchenbildung im Flüssigkeitszylinder

Sei $\xi = \frac{2\pi a}{\lambda}$ und $\lambda \cdot f = v_{\text{jet}}$, (λ = Wellenlänge, f = Piezofrequenz), dann wird

$$\delta = \delta_0 \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\right) = \delta_0 \cos\left(\xi \frac{x}{a}\right)$$

und

$$\Delta p = -\frac{\alpha \delta}{a^2} (1 - \xi^2).$$

Daraus ergeben sich folgende Bedingungen:

1. $\xi < 1 \Rightarrow \lambda > 2\pi a, \Delta p < 0 : \delta$ wächst an und der Jet wird instabil.
2. $\xi = 1 \Rightarrow \lambda = 2\pi a, \Delta p = 0 : \text{Der Jet bleibt stabil.}$
3. $\xi > 1 \Rightarrow \lambda < 2\pi a, \Delta p > 0 : \delta$ nimmt ab und der Jet wird zylindrisch.

Für die Tröpfchenbildung ist es also notwendig, dass $\lambda > 2\pi a$ oder $f < \frac{v_{\text{jet}}}{2\pi a}$ wird (für $v_{\text{jet}} = 10 \text{ m/s}$ und $a = 38 \mu\text{m} \Rightarrow f < 83 \text{ kHz}$). Eine Störung δ wachse dann exponentiell mit der Wachstumskonstante μ an [27]

$$\delta = \delta_0 e^{\mu t} \cos\left(\xi \frac{x}{a}\right).$$

Aus der Betrachtung der Druckverhältnisse in einer Scheibe des Flüssigkeitszylinders ergibt sich näherungsweise die Bewegungsgleichung für δ [36]:

$$\frac{\partial^2 \delta}{\partial t^2} - \frac{3\eta}{\rho} \cdot \frac{\partial^3 \delta}{\partial t \partial x^2} = -\frac{\alpha}{2\rho a} \cdot \frac{\partial^2}{\partial x^2} \left(\delta + a^2 \frac{\partial^2 \delta}{\partial x^2} \right).$$

Es folgt mit obigem Ansatz für μ

$$\mu^2 + \mu \cdot \frac{3\eta}{\rho a^2} \cdot \xi^2 = \frac{\alpha}{2\rho a^3} (1 - \xi^2) \xi^2$$

(η = Viskosität, ρ = Dichte) oder

$$\mu = -\frac{3}{2} \frac{\eta}{\rho a^2} \xi^2 \pm \left[\frac{\alpha}{2\rho a^3} (1 - \xi^2) \xi^2 + \left(\frac{3}{2} \frac{\eta}{\rho a^2} \xi^2 \right)^2 \right]^{1/2}.$$

Für eine nichtzähe Flüssigkeit ($\eta = 0$) wird

$$\mu = \sqrt{\frac{\alpha}{2\rho a^3} (1 - \xi^2) \xi^2}.$$

Mit $\xi_{\text{max}} = \sqrt{0.5}$ wird

$$\mu = \mu_{\text{max}} = \sqrt{\frac{\alpha}{8\rho a^3}}.$$

Für den Flüssigkeitsjet ergibt sich unter der Annahme einer Oberflächenspannung von Wasser bei 20°C ($\alpha = 0.073 \frac{\text{N}}{\text{m}}$) : $\mu_{\text{max}} = 1,3 \cdot 10^4 \left[\frac{1}{\text{s}} \right]$. Nimmt man eine typische Zeit T von $500 \mu\text{s}$ für den Tröpfchenabriss, so ergibt sich eine

Amplitude $\delta_0 = \frac{a}{e^{\mu_{\max} T}}$ für die Primärstörung in der Größenordnung von 57 nm.

Wichtig für die Tröpfchenbildung ist die Wellenlänge bzw. Frequenz bei gegebener Jetgeschwindigkeit. Für $\lambda = v_{\text{jet}}/f$ ergibt sich

$$\lambda_{\min} = \pi d_{\text{jet}}$$

für $\xi \rightarrow 1$ ($d_{\text{jet}} = \text{Jetdurchmesser}$)

$$\lambda_{\text{opt}} = \frac{\pi}{\xi_{\max}} d_{\text{jet}} = 4,508 d_{\text{jet}}$$

$\lambda_{\max} \rightarrow \infty$ für $\xi \rightarrow 0$.

In der Praxis ist noch der Einfluss des Luftdrucks auf die Oberflächenspannung zu berücksichtigen. Unter der Annahme, dass v_{jet} klein gegen die Schallgeschwindigkeit ist, lässt sich näherungsweise für μ schreiben:

$$\mu^2 + \mu \frac{3\eta}{\rho a^2} \xi^2 = \frac{\alpha}{2\rho a^3} (1 - \xi^2) \xi^2 + \frac{\rho_{\text{Luft}} v_{\text{jet}}^2}{2\rho a^3} \xi^3 f_0(\xi),$$

wobei η die Viskosität, ρ die Dichte der Jetflüssigkeit, a der Radius des Jets und $f_0(\xi)$ der Quotient aus zwei Hankelfunktionen $H_0(\xi)$ und $H_1(\xi)$ ist.

Experimentell ergibt sich

$$\lambda_{\min} < \lambda_{\text{opt}} \leq 4,508 d_{\text{jet}} \leq \lambda_{\max} \leq 18 d_{\text{jet}}.$$

Somit lässt sich der Tröpfchenabriss und damit der Abstand zum Analysepunkt durch folgende Parameter variieren:

1. Durchmesser der Düse und damit des Jets,
2. Jetgeschwindigkeit,
3. Piezofrequenz,
4. Piezoamplitude.

Für einen Jet von 76 µm ergibt sich als günstig in der Praxis ein Tröpfchenabriß nach 16 Tröpfchen. Bei Verwendung verschiedener Düsen 1 und 2 mit entsprechenden Jetdurchmessern d_1 und d_2 , lassen sich die jeweiligen Bedingungen ineinander überführen, wenn man folgende Verhältnisse für die Drücke p_1 in Düse 1 und p_2 in Düse 2 bzw. die entsprechenden Frequenzen f_1 und f_2 berücksichtigt:

$$\frac{p_1}{p_2} = \frac{d_2}{d_1} = \frac{v_1^2}{v_2^2}$$

$v_i = \lambda_i f_i$ und $\lambda_i \sim d_i$ mit $i = 1, 2$

$$\frac{f_1}{f_2} = \sqrt{\frac{d_2^2}{d_1^2}} = \sqrt{\frac{p_1^2}{p_2^2}}.$$

10.4 Fluoreszenzmarkierung

Die für die Flusszytometrie wichtigsten Eigenschaften eines Fluoreszenzfarbstoffs sind dessen Absorptionsspektrum, für das geeignete Laserwellenlängen zur Verfügung stehen müssen, und dessen Emissionsspektrum, das möglichst wenig mit dem anderer Farbstoffe überlappen soll, sodass es durch geeignete Filter separierbar ist. Schließlich spielen Quanteneffizienz und Photostabilität eine weitere Rolle für die Sensitivität der Messung. Daneben muss beachtet werden, dass Fluorochrome ihre spektralen Eigenschaften abhängig von ihrer molekularen Umgebung, dem pH, der Anwesenheit bestimmter Ionen usw. ändern können. Dies nutzt man z.B. bei DAPI, dessen Fluoreszenzintensität bei Anlagerung an doppelsträngige DNA etwa um einen Faktor 18 steigt, oder Acridine Orange, dessen Fluoreszenzwellenlänge von der Bindung an einzelsträngige (rot) oder doppelsträngige (grün) Nukleinsäuren abhängt. Ein anderes Beispiel stellen die bereits besprochenen kombinatorischen Farbstoffkonjugate oder das Quenching der Fluoreszenz von Hoechst 33342 in Anwesenheit von Bromdesoxyuridin dar.

Es gibt grundsätzlich zwei Klassen von Fluorochromen in der Flusszytometrie; die einen binden mehr oder weniger spezifisch direkt an innere Strukturen von Zellen (z.B. DNA), die anderen binden an spezifische Sonden. Monoklonale Antikörper sind hierbei die am meisten verwendeten Sonden. Durch ihren Einsatz hat sich die Flusszytometrie auf ihrem Hauptanwendungsgebiet, der immunologischen Zellcharakterisierung, weltweit zu einer Routineteknik entwickelt, die in nahezu jeder größeren Klinik zu finden ist.

Monoklonale Antikörper sind entweder direkt (kovalent) mit Farbstoffen markiert oder indirekt, z.B. über eine Biotin-Streptavidin-Brücke oder über einen weiteren Antikörper gegen Immunglobulin. Dies wird ausführlich in dem am Ende zitierten Buch von Polak und van Noorden beschrieben. Mittlerweile ist jedoch ein breites Spektrum direkt markierter monoklonaler Antikörper und markierter Antiimmunglobuline von verschiedenen Herstellern kommerziell erhältlich, sodass es selten notwendig sein wird, eigene Reagenzien im Labor herzustellen. Tabelle 10.2 fasst einige Fluorochrome für die Antikörpermarkierung und ihre Absorptions- und Emissionsmaxima im ungebundenen Zustand zusammen.

Von der zweiten Klasse an Fluorochromen, die spezifisch an innere Zellstrukturen bilden, stellen die, die stoichiometrisch an Nukleinsäuren binden, für quantitative Messungen in der Zellbiologie und Zytogenetik die wichtigste Gruppe dar. So können hiermit z.B. Zellzyklusuntersuchungen über DNA-Histogramme, Vitalitätsuntersuchungen in der Strahlenbiologie, Untersuchungen zur Zellproliferation und zu Apoptose, aber auch Flusskaryotypisierung oder biologische Dosimetrie durchgeführt werden. Tabelle 10.3 fasst einige dieser Farbstoffe und ihre Absorptions- und Emissionsmaxima im an Nukleinsäuren gebundenen Zustand zusammen.

Tabelle 10.2. Fluorochrome für die Antikörpermarkierung

Fluorochrom	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Fluorescein	495	520
Phycoerythrin-R	495, 564	576
Texas Red	596	620
Phycoerythrin/Texas Red Konj.	495	620
Phycoerythrin/Cyanin 5 Konj.	495	670
Coumarin	357	460
Allophycocyanin	650	660

Tabelle 10.3. Fluorochrome für Zellzyklusuntersuchungen

Fluorochrom	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
<i>Interkalatoren</i>		
Propidium Jodid	495, 342	639
Ethidium Bromid	493, 320	637
Acridine Orange	503	530 (DNA), 640 (RNA)
<i>AT-Farbstoffe</i>		
Hoechst 33258	395	450
Hoechst 33342 (färbt auch vitale Zellen)	395	450
DAPI (4', 6-Diamidino- 2-phenylindol)	372	456
<i>GC-Farbstoffe</i>		
Mithramycin	445	569
Chromomycin A3	430	580

AT-Farbstoffe: Adenin, Thymin bevorzugend

GC-Farbstoffe: Guanin, Cytosin bevorzugend

10.5 Slit-Scan-Analyse und Sortierung

Während die bisher beschriebene Technik längst als „Black Box“ Einzug in das klinische Routineleben gehalten hat, stellt die Slit-Scan-Analyse und Sortierung eine Sonderform dar, die bisher einigen Forschungs- und Entwicklungslabors vorbehalten blieb. Die Ursachen liegen einerseits in den erhöhten physikalischen Anforderungen hinsichtlich der optischen Auflösung und Komplexität der Datenverarbeitung, andererseits darin, dass bisher die Hauptanwendung auf dem Gebiet der Chromosomenanalyse lag, was hohe physiko-chemische Anforderungen an Präparation und Fluoreszenzmarkierung stellt. Trotzdem soll auf diese Technik wegen ihres möglichen großen Anwendungspotenzials eingegangen werden.

tentials hier eingegangen werden. Eine übersicht mit weiterführenden Literaturangaben findet man u.a. in [13].

Das wesentliche Potential eines Slit-Scan-Systems liegt in der Möglichkeit, sehr schnell sehr viele Chromosomen (typisch bis zu 1000/s) zu analysieren und seltene Aberrationen zu detektieren und zu sortieren. Dies erlaubt den Einsatz in der sog. „biologischen Dosimetrie“, d.h. gerade dann, wenn keine physikalischen Messmethoden zur Verfügung stehen, anhand der Rate bestimmter Chromosomenaberrationen (dizentrische Chromosomen, Translokationschromosomen) auf die Dosis einer individuellen Strahlenexposition zurückzuschließen.

Aufgrund ihres Geschwindigkeitsvorteils gegenüber klassischen nichtautomatisierten Mikroskopieverfahren war die Slit-Scan-Durchflusszytometrie homogen fluoreszenzgefärbter Chromosomen bereits vor 10 Jahren eine interessante Alternative für die biologische Dosimetrie auf der Basis dizentrischen Chromosomen. Das Prinzip ist in Abb. 10.1 bereits dargestellt. Nachdem die mitotischen Zellen mechanisch aufgebrochen sind, werden die isolierten Chromosomen in Suspension geeignet fluoreszenzgefärbt. Diese Suspension wird im Slit-Scan-Durchflusszytometer in den HÜllstrom injiziert, sodass die Chromosomen nacheinander den Fokus eines bandförmig auf $1-2\text{ }\mu\text{m}$ Breite fokussierten Laserstrahls durchqueren. Im Fall einer Mehrfachanregung sind zwei schmale Bänder der Anregungsstrahlung hintereinander zu durchlaufen.

Aufgrund der hydrodynamischen Fokussierung werden die Chromosomen mit ihrer Längsachse in Richtung des Flüssigkeitsstrahls und senkrecht zu dem abtastenden Laserstrahl orientiert. Die beim Durchgang des Chromosoms durch einen bandförmigen Laserfokus angeregte Fluoreszenz wird durch Photomultiplier registriert und führt zu einem zeitlich aufgelösten Slit-Scan-Profil, das der lokalen Fluoreszenzverteilung auf dem Chromosom entspricht. Die Verdoppelung der Detektionseinheit erlaubt beim Einsatz entsprechender optischer Filter die simultane Aufnahme von zwei Fluoreszenzfarben.

Bei einer direkten DNA-Färbung (z.B. mit DAPI oder Propidium-Jodid) besitzt dieses Chromosomenprofil ein charakteristisches Minimum im Bereich des Zentromers, dessen relative Lage einen Klassifikationsparameter normaler Chromosomen darstellt. Bei dizentrischen Chromosomen erhält man das Profil eines verlägerten Objekts mit zwei Zentromerminima (Abb. 10.6).

Eine weitere Verbesserung der biologischen Dosimetrie könnte, wie auch in der Mikroskopie, mittels einer Translokationsanalyse von Metaphasechromosomen peripherer Lymphozyten angestrebt werden. Bei einer Markierung durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Übersicht: [5]) von bestimmten Chromosomen in einer Suspension für grüne FITC-Fluoreszenz und mit Gegenfärbung aller Chromosomen mit einem DNA-Farbstoff, z.B. mit Propidium-Jodid für rote Fluoreszenz oder mit DAPI für blaue Fluoreszenz, sind Translokationschromosomen zusätzlich durch ein Profil mit hoher FITC-Fluoreszenz des markierten Chromosomenanteils und mit niedriger FITC-Fluoreszenz des nicht markierten Teils desselben Chromosoms charakterisiert.

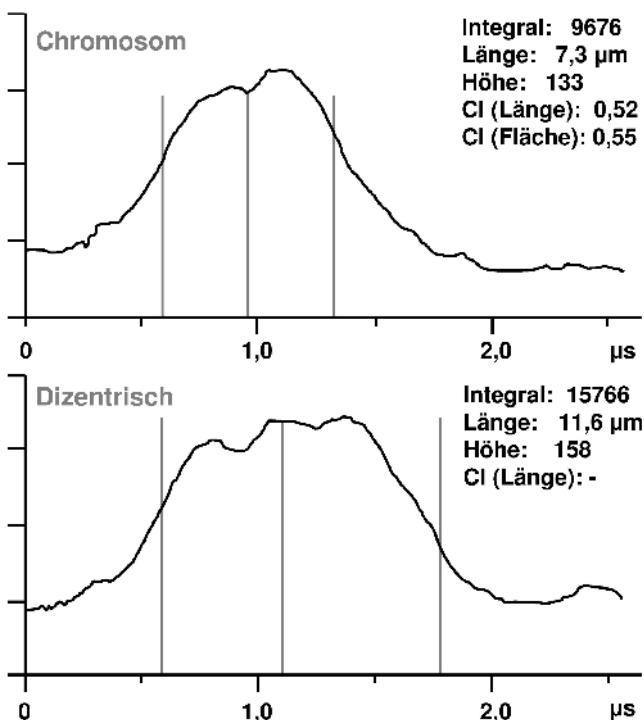


Abb. 10.6. Slit-Scan-Profil eines monozentrischen Chromosoms und eines dizentrischen Chromosoms. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensität von Propidium Jodid gegen die Flugzeit des Chromosoms durch den Laserfokus in Einheiten von 10 ns. Bei konstanter Flussgeschwindigkeit entspricht dies der relativen Chromosomenlänge ($v = 10 \text{ m/s}$; 10 ns entsprechen 100 nm). Die senkrechten Linien kennzeichnen Anfang und Ende des Profils sowie Zentromer- bzw. Maximumposition, die automatisch berechnet werden. CI = Zentromerindex = relative Lage des Zentromers auf dem Chromosom

Bei dem Slit-Scan-Verfahren bestimmen Signalfolge und Signallänge eines Chromosomenprofils sowie die Flussgeschwindigkeit die Anforderung an ein Datenverarbeitungssystem. Für den Einsatz in der biologischen Dosimetrie ist nicht nur eine entsprechende Verarbeitungsleistung wichtig, sondern auch eine Mess- und Bedienungsumgebung, die den Routineeinsatz und die Analyse großer Partikelzahlen in einer einzigen Messung ermöglicht. Das Fluoreszenzprofil eines Chromosoms hat bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 m/s und einer typischen Chromosomenlänge von 2–15 μm eine zeitliche Länge von 0,2–1,5 μs. Dieses Signal wird mit einer solchen Frequenz digitalisiert, dass kurze Signale noch aufgelöst, lange Signale aber nicht überabgetastet werden. Für die Sortierung muss die Online-Analyse der Fluoreszenzparameter, abhängig von der Frequenz des Piezokristalls an der Düse, in weniger als 500 μs (Zeit für den Chromosomenfluss zwischen Laserinteraktionspunkt und

Tröpfchenabriß) durchgeführt und der Sortierentscheid getroffen sein. Die erforderliche Echtzeitdatenverarbeitung stellt auch an moderne Computer hohe Anforderungen, ist jedoch mittlerweile mit entsprechenden Workstations erreichbar. So wurde an der Universität Heidelberg ein solcher Slit-Scan-Sorter realisiert: Es handelt sich dabei um ein System mit einem standardmäßigen freien Jet, der eine Flussgeschwindigkeit von 10 m/s hat. Die Anregungsoptik erzeugt einen Laserspalt von 1,4 μm Breite bei einer Wellenlänge von 488 nm. Aufgrund der Kombination von sphärischen und Fresnel-Linsen konnten optische Aberrationen weitgehend unterdrückt werden.

Für die Datenverarbeitung wurden Hard- und Software teilweise komplett neu entwickelt. Es handelt sich um ein VMEbus basiertes System mit 100 MHz flash-ADC, einer Rechnerkarte mit zwei M68040 Prozessoren (Eurocom 17) und einer Sortersteuerung für Einzeltröpfensortierung mit einer Genauigkeit von 0,1 kHz Piezofrequenz. Die Chromosomen können in Echtzeit simultan nach Länge, integraler Intensität von drei Farben und Centromerindex analysiert werden. Je nach Profillänge dauert die reine Chromosomenanalyse 375–430 μs . Bei einem positiven Sortentscheid synchronisiert die Sorterkarte den Sortbefehl mit dem Tröpfchenabriß, sodass die Sortierung in weniger als 500 μs erfolgt ist. Es können stabil bis zu 1600 Chromosomen pro Sekunde analysiert und sortiert werden. Abhängig von der Chromosomenpräparation werden Sortierreinheiten von weit über 90% erreicht.

Literatur

1. Arndt-Jovin DJ, Grimwade BG, Jovin TM (1980) A dual laser flow sorter utilizing a CW pumped dye laser. *Cytometry* 1:127–131
2. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV (1992) Clinical flow cytometry: principles and applications. Williams und Wilkins, Baltimore
3. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA (1972) Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instr* 43:404–409
4. Coulter WH (1956) High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc Natl Electron Conf* 12:1034–1042
5. Cremer C, Aldinger K, Popp S, Hausmann M (1995) Erkennung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen mittels Fluoreszenz-Hybridisierung und Bildanalyse. *Z Med Phys* 5:9–18
6. Crosland-Taylor PJ (1953) A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* 171:37–38
7. Darzynkiewicz Z, Crissman HA (1990) Flow cytometry: methods in cell biology. (Vol 33) Academic Press, San Diego
8. Dean PN, Pinkel D (1978) High resolution dual laser flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 26:622–627
9. Fulwyler MJ, Glascock RB, Hiebert RD, Johnson NM (1969) Device which separates minute particles according to electronically sensed volume. *Rev Sci Instr* 40:42–48
10. Givan AL (1992) Flow cytometry: first principles. Wiley-Liss, New York

11. Göhde W, Schliermann M, Miltenburger HG, Schumann J (1985) Durchfluss-Zytofluorometrie zur Routineuntersuchung von Zellkulturen in der Biotechnologie. *Forum Mikrobiol* 8:231–237
12. Haenlein A (1931) über den Zerfall eines Flüssigkeitsstrahls. *Forschung auf dem Gebiet des Ingenieurswesens* 2:117–152
13. Hausmann M, Dölle J, Cremer C (1996) Slit-Scan Durchflusszytometrie von Chromosomenaberrationen: Perspektiven in der Biologischen Dosimetrie. *Z Med Phys* 6:59–67
14. Hulett HR, Bonner WA, Barret J, Herzenberg LA (1969) Cell sorting: Automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166:747–749
15. Hulett HR, Bonner WA, Sweet RG, Herzenberg LA (1973) Development and application of a rapid cell sorter. *Clin Chem* 19:813–816
16. Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H (1965) Spectrophotometer: new instruments for ultrarapid cell analysis. *Science* 150:630–631
17. Lebo RV, Bruce BD, Dazin PF, Payan DG (1987) Design and application of a versatile triple-laser cell and chromosome sorter. *Cytometry* 8:71–82
18. Macey MG (1994) Flow cytometry: clinical applications. Blackwell Scientific, Oxford
19. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (1990) Flow cytometry and sorting (2nd edn) Wiley-Liss, New York
20. Merrington AC, Richardson EG (1947) The break-up of liquid jets. *Proc Phys Soc* 59:1–13
21. Moldavan A (1934) Photo electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 80:188–189
22. Ormerod MG (1994) Flow cytometry: a practical approach (2nd edn) IRL Press, Oxford
23. Ormerod MG (1994) Flow cytometry. Royal Microscopical Society Microscopy Handbook 29. BIOS Scientific, Oxford
24. Polak JM, Van Noorden S (1984) An introduction to immunochemistry: current techniques and problems. Royal Microscopical Society Handbook 11. Oxford University Press, Oxford
25. Radbruch A (1992) Flow cytometry and cell sorting. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
26. Rayleigh JWS (1878) On the instability of jets. *Proc Lond Math Soc* 10:4–13
27. Rayleigh JWS (1892) On the instability of a cylinder of viscous liquid under capillary force. *Phil Mag* 34:145–154
28. Robinson JP (1993) Handbook of flow cytometry methods. Wiley-Liss, New York
29. Stöhr M (1976) Double beam applications in flow techniques and recent results. In: Göhde W, Schumann J, Büchner T (eds) Pulse-Cytophotometry II. Europ Press, Gent: 39–45
30. Stovell RT (1977) The influence of particles on jet breakoff. *J Histochem Cytochem* 25:813–820
31. Sweet RG (1965) High-frequency recording with electrostatically deflected ink jets. *Rev Sci Instr* 36:131–136
32. Tatsumi T (1952) Stability of the laminar inlet-flow prior to the formation of Poiseuille regime. *I J Phys Soc Jpn* 7:489–495
33. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR (1969) Cell micro fluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163:1213–1214

34. Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR (1985) Flow cytometry instrumentation and data analysis. Academic Press, Orlando
35. Watson JV (1991) Introduction to flow cytometry. Cambridge University Press, Cambridge
36. Weber C (1931) Zum Zerfall eines Flüssigkeitsstrahles. *Zs angew Math Mech* 11:136–155

11 Optische Datenerfassung und -verarbeitung

H. Tiziani

11.1 Optische Datenspeicherung und -wiedergabe bei CD

Die optische Datenspeicherung erlangt immer mehr Bedeutung in der Technik und Medizin. Dies wird verstört durch die Einfung des Lasers, leistungsfigere Rechner und Speicher. Beispielhaft wird die Informationsaufnahme und -wiedergabe anhand des konfokalen optischen Prinzips diskutiert.

Die Datenspeicherung und -wiedergabe der CD-Player arbeitet konfokal. Das Prinzip ist in Abb. 11.1 skizziert. Ein Laserparallelbndel wird mit einer $NA = 0,4$ Linse mit einer Spot-Breite von ca. $1\mu\text{m}$ auf die Disk-Oberfche fokussiert (Abb. 11.1a). Fällt der Fokus in ein „pit“, eine Vertiefung, so wird das Licht gestreut und durch destruktive Interferenz nicht mehr auf die Photodiode (die als punktfmiger Detektor wirkt) fokussiert. Das Laserbndel wird durch eine ca. 1 mm dicke Schicht aus durchsichtigem Plastik auf den Informationsträger (Al-Schicht mit Vertiefungen) fokussiert.

Für eine Pit-Vertiefung von $\Delta h = \frac{\lambda}{4n}$ ergibt sich nach diesem einfachen Prinzip eine optimale Signalstärke (Abb. 11.1b); das Streulicht ist um 180° gegen die nullte Ordnung phasenverschoben. n ist die Brechzahl des Kunststoffs, λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts.

Die technologische Realisierung ist naturgemäß etwas komplexer. Insbesondere muss hier für eine radiale Nachführung und eine Fokusnachfhrung, also eine Autofokuseinrichtung, gesorgt sein. Der optische Strahlengang eines realistischen optischen CD-Auslesesystems nach [8], inklusive Autofokus und Kompensation von Spurabweichungen, ist in Abb. 11.2 skizziert.

Eine bei $\lambda = 780\text{ nm}$ emittierende Infrarotlaserdiode wirkt als Punktlichtquelle. Das Strahlungsbündel mit elliptischem Querschnitt (die aktive Zone der Diode ist rechteckig) wird durch eine hier nicht eingezeichnete Optik kollimiert [2].

Die Infrarotstrahlung fällt durch einen Strahlteiler auf das eigentliche Objektiv O_s . Dies ist entweder eine einzelne, asphärische Linse oder aber ein zusammengesetztes Objektiv aus sphärischen Linsen. Die NA beträgt 0,45, die Brennweite i. Allg. 8 mm, und das Gewicht ist < 2 g. Das Gewicht muss gering sein, um das Objektiv schnell nachführen zu können. Dazu befindet es sich z.B. in einer magnetischen Halterung innerhalb einer Spule. Der Fokus fällt durch die 1 mm starke transparente Schutzschicht auf die informationstragende Aluminiumschicht. Die vergleichsweise große Entfernung zwischen

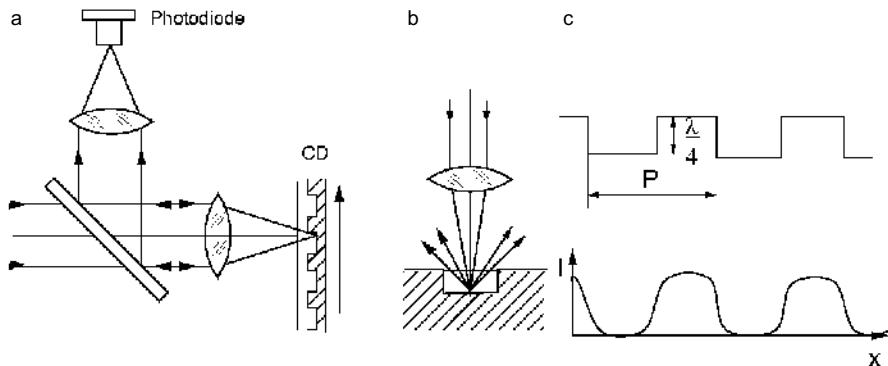


Abb. 11.1. (a) CD-Prinzip (b) Streuung an Pit, (c) Ausgangssignal für $\lambda/4$ Pits [4]

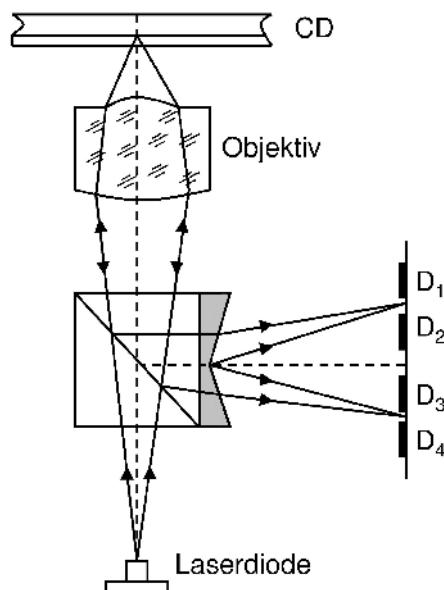


Abb. 11.2. Schematischer Strahlengang eines optischen Auslesesystems [8]

Datenschicht und CD-Oberfläche macht das Auslesesverfahren unempfindlich gegen Staub und kleinere Kratzer auf der Oberfläche. Das reflektierte Licht wird über den Strahlteiler und zwei schmalwinkelige Prismen auf insgesamt 4 Detektoren geführt. Diese Einheit hat 3 Funktionen:

1. Das Lichtbündel wird parallel zur Signalspur auf der CD in 2 Teile aufgespalten. Das Differenzsignal der Detektoren D1 und D2 auf der einen und D3 und D4 auf der anderen Seite, also $D1+D2-D3-D4$, gibt Spurabweichungen an.

2. Betrachten wir nur das Licht, das von einer Prismenhälfte auf zwei Detektoren abgelenkt wurde, also z.B. auf D1 und D2. Sie werden die gleiche Intensität messen, wenn das reflektierte Feld auf die Detektoren fokussiert ist. Eine Defokussierung führt zu einer Intensitätsdifferenz. Die Größe $D1 - D2 - D3 + D4$ kann also als Autofokus-Signal genutzt werden (pupil obscuration method).
3. Die Summe der gemessenen Intensitäten $D1 + D2 + D3 + D4$ ist schließlich das eigentliche Nutzsignal.

Diese Variante des Foucault-Schneidenverfahrens ist nicht das einzige Verfahren zur Detektion von Spurlage, Fokus und Signal. Andere arbeiten z.B. nach einer astigmatischen Fokussiermethode.

11.1.1 Konfokale Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde 1955 von Marvin Minsky, Professor am Massachusetts Institute of Technology in Cambridge, eher beiläufig erfunden. Minsky ist einer der Pioniere des Forschungsgebiets der künstlichen Intelligenz. Er entwickelte das Verfahren, um Proben von menschlichen Gehirnzellen untersuchen zu können. Er wollte verhindern, dass zu untersuchende Objekt mit einem Mikrotom in dünne Schichten zerschneiden zu müssen, deren Dicke im Bereich der Schärfentiefe des Mikroskops liegt, um die Schnitte dann einzeln untersuchen zu können. Abgesehen davon, dass es ein aufwendiger Arbeitsvorgang ist, können beim Schneiden feine Objektdetails verändert oder beschädigt werden. Mit dem von Minsky 1961 patentierten konfokalen Mikroskop war es nun möglich, Schnittbilder eines dreidimensionalen Objekts auf optischem Wege zu gewinnen, ohne das Objekt zerschneiden zu müssen. Das Instrument fand damals allerdings keinen Anklang. Erst 30 Jahre später begann sich das Verfahren durchzusetzen. Mittlerweile ist es ein etabliertes Verfahren mit einer großen Vielfalt von Anwendungen geworden, insbesondere in der Biologie [1].

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei der das gesamte Objektfeld möglichst gleichmäßig beleuchtet wird, erfolgt dies bei der konfokalen Mikroskopie punktweise. Beispielsweise wird ein Objektpunkt im Objektvolumen punktweise beleuchtet (z.B. durch einen fokussierten Laserstrahl) und (in Transmission) auf eine Blende (Pinhole) mit dahinter liegendem Detektor oder auf einen Punkt detektor abgebildet (Abb. 11.3). Die Foki von Objektiv und Kollektor fallen zusammen, daher der Name *konfokale Mikroskopie*.

Bei reflektierenden bzw. undurchsichtigen Objekten wird das reflektierte Licht vom selben Objektiv über einen Strahlteiler auf eine Blende (Pinhole) fokussiert (Abb. 11.4), hinter der sich ein Detektor befindet. Die Blende ist für die tiefendiskriminierende Wirkung des konfokalen Prinzips verantwortlich, denn nur, wenn der Messpunkt sich im Fokus des Objektivs befindet, gelangt der Großteil des Lichts durch die Blende zum Detektor. Befindet sich das

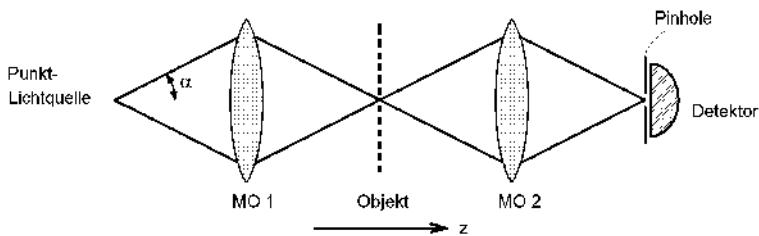


Abb. 11.3. Prinzip der konfokalen Mikroskopie in Transmission

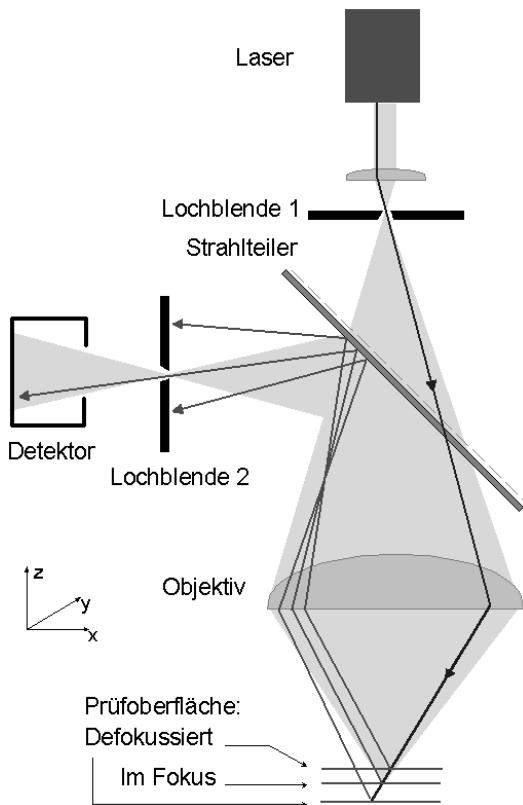


Abb. 11.4. Prinzip der konfokalen Mikroskopie in Reflexion

Messobjekt nicht im Fokus, vergrößert sich der Lichtfleck auf der Blende, und weniger Licht passiert die Blende. Der Lichtfluss durch die Blende zum Detektor nimmt ab, wie dies anhand des Ausdrucks $I(z)$ in (11.1) ersichtlich ist.

$$I(z) = \left[\frac{\sin \left\{ \frac{2\pi}{\lambda} (1 - \cos \alpha) z \right\}}{\frac{2\pi}{\lambda} (1 - \cos \alpha) z} \right]. \quad (11.1)$$

Halbwertsbreite:

$$\text{HWB} = \frac{0,443\lambda}{1 - \cos \alpha}. \quad (11.2)$$

Die Intensitätsverteilung entlang der z -Achse ist auch in [1] zu finden. Ein wichtiges Merkmal ist die Halbwertsbreite bei der Durchfokussierung entlang der optischen Achse. Letztere ist von der Wellenlänge λ und der numerischen Apertur NA des Linsensystems abhängig.

Bei dem bisher vorgestellten konfokalen Prinzip wurde ein Laserstrahl oder eine Punktlichtquelle auf das Objekt abgebildet und das vom Objekt ausgehende Licht auf einen Punkt detektor fokussiert, sodass stets nur ein einziger Objektpunkt vermessen werden kann. Um einen kompletten optischen Höhenschnitt erstellen zu können, muss das Objekt daher noch dreidimensional abgerastert werden. Das Abtasten des Messobjekts im Rasterverfahren ist mittlerweile auf vielfältige Weise umgesetzt worden, z.B. durch Piezoverstellelemente parallel zur optischen Achse (z) und durch Verfahren des Objekttisches in (x, y) (Abb. 11.4). Durch die Abrasterung ist es nun möglich, von einem dreidimensionalen Objekt nur die Zone (optischer Schnitt) wiederzugeben, welche in der Brennebene des Objektivs liegt.

Vorteile der konfokalen Messprinzipien:

- Der laterale Kontrast wird dadurch verbessert, dass in der Objektebene nur ein seitlich eng begrenzter Bereich gleichzeitig beleuchtet wird. Die benachbarten Bereiche sind nicht beleuchtet und können demzufolge auch kein Streulicht beitragen, das einen intensitätsschwachen Objektpunkt überstrahlen würde.
- Die essentielle Idee des Verfahrens ist aber die Verbesserung des vertikalen Kontrastes durch einen Pinhole-Detektor. Das Pinhole, z.B. von einem Photomultiplier, befindet sich genau im Blickpunkt des Fokuspunkts des Objektivs. Licht aus diesem Volumen wird auf das Pinhole fokussiert und kann damit durch das Pinhole hindurch zum Detektor gelangen. Streulicht aus vor oder hinter dem Fokus liegenden Bereichen wird dagegen fokussiert auf das Pinhole abgebildet und kann damit zum größten Teil nicht mehr zum Detektor gelangen. Wird das Objekt lateral abgetastet, so trägt nur Licht aus einer eng begrenzten Ebene zum Bild bei. Das heißt aber, dass von transparenten Objekten Schnittebenen abgebildet werden können, ohne das Objekt zu zerstören.
- Die gleichen Eigenschaften besitzt die Anordnung in Reflexion. Hier wirkt ein optisches System gleichzeitig als Objektiv und als Kollektor (vgl. Abb. 11.3b).

11.1.2 Bildübertragung

Im Folgenden soll die Bildübertragung im konfokalen Mikroskop kurz diskutiert werden.

Für die Breite Δy und Länge Δz eines beugungsbegrenzten Fokus gilt

$$\Delta y \approx \frac{\lambda}{2NA}, \quad \Delta z \approx \frac{2\lambda}{NA^2}, \quad (11.3)$$

(NA = numerische Apertur). Das Punktbild $F(x', y')$ im konfokalen Laser-scanningmikroskop weicht etwas von der klassischen Bildübertragung ab. Das Bild $A'(x', y')$ ist, wenn $A(x, y)$ das Objekt beschreibt

$$A'(x', y'') = \iint A(x, y) F(x' - x, y' - y) dx dy, \quad (11.4)$$

was eine Faltung vom Objekt mit dem Punktbild darstellt. Das Punktbild wird verschoben, alternativ kann auch das Objekt verschoben werden, sodass

$$A'_1(x', y') = \iint A(x' - x, y' - y) F(x', y') dx dy. \quad (11.5)$$

Dies gilt z.B. für den Punktdetektor auf der optischen Achse und xy -Rasterung des Objekts.

Wird eine Punktlichtquelle berücksichtigt, die auf den Punktdetektor abgebildet wird, so gilt nach zweimaliger Abbildung mit gleichem optischen System (z.B. in Reflexion) $A(x, y) \rightarrow \delta(x, y)$.

$$g(x', y') = A'_1(x', y') = \iint \delta(x' - x, y' - y) [F(x, y)]^2 dx dy = [F(x', y')]^2. \quad (11.6)$$

Das heißt, das Punktbild $g(x', y')$ der kohärenten konfokalen Abbildung ist das Quadrat des Punktbildes des Einzelobjektivs. Das kohärente Punktbild ist die Fourier-Transformierte der Pupillenfunktion des abbildenden Objektivs.

Für eine kreisförmige Öffnung wird

$$[F(x', y')]^2 = \left[2 \frac{J_1 \frac{2\pi}{\lambda} N A r}{\frac{2\pi}{\lambda} N A r} \right] \quad (11.7)$$

für $x'^2 + y'^2 = r^2$.

Nach dem Faltungssatz ist die konfokale Übertragungsfunktion im Frequenzbereich die Faltung der kohärenten Übertragungsfunktion des Einzelobjektivs mit sich selbst.

Die Grenzfrequenz (d.h. das inverse laterale Auflösungsvermögen) beträgt demnach wie bei der inkohärenten, parallelen Abbildung

$$\frac{2NA}{\lambda}. \quad (11.8)$$

Die Übertragungsfunktion der inkohärenten, parallelen Abbildung (die OTF) ist die Autokorrelation der kohärenten Übertragungsfunktion. Die konfokale Übertragungsfunktion ist dagegen eine Art „Autofaltung“ der kohären-

ten, parallelen Übertragungsfunktion – dies ist i. Allg. nicht dasselbe. Für eine einfache, zirkulare Pupille ist es aber doch dasselbe, weil die Pupillenfunktion reell und x und y symmetrisch ist.

Um ein vollständiges Bild eines Objekts zu erhalten, werden im ersten Schritt die konfokalen Bilder für verschiedene vertikale Ebenen gemessen. Anschließend müssen die gemessenen „Scheiben“ zu einem Objektbild zusammengesetzt werden. Im Ergebnis erhalten wir ein mikroskopisches Bild mit hoher Tiefenschärfe, ohne dass die laterale Auflösung verringert wird, wie es zur Erhöhung der Tiefenschärfe in der konventionellen Mikroskopie geschehen muss.

Wie geht dieses nachträgliche Zusammensetzen des Bildes vor sich? Das einfachste Verfahren ist der ausgedehnte Fokus (extended focus). Hier wird für jeden Pixel das Integral über die vertikal gemessene Intensitätsverteilung gebildet. Man erhält damit Bilder, die aussehen wie normale mikroskopische Aufnahmen, aber mit extrem großer Tiefenschärfe bei gleichzeitig hoher numerischer Apertur.

11.1.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Wegen der Möglichkeit, optische Schnitte durch transparente Objekte zu legen, ohne die Objekte zerstören zu müssen, erfreut sich die konfokale Mikroskopie gerade in Medizin und Biologie außerordentlicher Beliebtheit. Ein Hauptanwendungsgebiet dort ist die Fluoreszenzmikroskopie. Durch Mikroinjektion bestimmter Farbstoffe werden Zellbestandteile wie Proteine und Lipide spezifisch angefärbt. Bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge λ_1 emittieren sie Fluoreszenzlicht einer (normalerweise größeren) Wellenlänge λ_2 . Damit kann die räumliche Verteilung der so markierten Substanzen sichtbar gemacht werden. Speziell in der Genetik werden synthetisierte DNA-Stücke mit Farbstoffmolekülen markiert und in eine zu analysierende DNA-Kette eingebaut. Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann die räumliche Verteilung im Chromosom sichtbar gemacht werden.

Hier trifft es sich gut, dass das Auflösungsvermögen der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur „normalen“ kohärenten, konfokalen Mikroskopie nochmal um ca. den Faktor 2 besser ist. Diese genügte aber bereits der (inkohärenten) Rayleigh-Auflösungsgrenze von $\frac{\lambda}{2NA}$. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie unterbieten wir also deutlich die Rayleigh-Auflösungsgrenze.

Der Schlüssel für diesen Effekt ist die Tatsache, dass für die Anregung des Fluoreszenzlichts nicht die Amplitude der Anregung, sondern die Intensität des einfallenden Lichts wesentlich ist. Außerdem wird das Fluoreszenzlicht inkohärent abgestrahlt, d.h. vom Objektiv wird die Intensität linear übertragen.

Die Punktantwort für diesen Fall können wir analog zum vorhergehenden Abschnitt herleiten: Beleuchten wir ein Molekül mit einer ebenen Welle der Anregungswellenlänge λ_1 . Daraufhin wird Licht der Wellenlänge λ_2 emittiert.

Demnach wird das Bild bei inkohärenter Betrachtung

$$B'(x', y') = \iint B(x, y) G(x' - x, y' - y) dx dy, \quad (11.9)$$

wobei $G(x', y')$ die Punktantwort bei inkohärenter Beleuchtung und B' und B Bild bzw. Objektintensitäten sind.

$$G(x', y') = |F(x', y')|^2. \quad (11.10)$$

Für die konfokale Anordnung heißt dies

$$B'(x', y') = \iint B(x, y) |G_1(x' - x, y' - y)| |G_2(x' - x, y' - y)| dx dy. \quad (11.11)$$

Für $B(x, y) = \delta(x, y)$ und $\lambda_1 \approx \lambda_2$ ergibt sich das Punktbild zu

$$B'(x', y') = |G(x', y')|^2 = |F(x', y')|^4. \quad (11.12)$$

Die optische Übertragungsfunktion, also die Fourier-Transformierte des Punktbildes ist die Faltung der inkohärenten Übertragungsfunktion des Objektivs bzgl. der Wellenlängen λ_1 und λ_2 , – und diese waren jeweils die Autokorrelation der kohärenten Übertragungsfunktionen. Die Grenzfrequenz beträgt demnach

$$2NA \left(\frac{1}{\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2} \right).$$

Für $\lambda_1 \approx \lambda_2$ ist die Grenzfrequenz demnach $4NA/\lambda$. Diese Zahl sollte man aber nicht überbewerten – für Frequenzen über $2NA/\lambda$ wird die Übertragungsfunktion sehr schwach. Die Ortsfrequenzen sind aber vorhanden und können durch spezielle Detektionsverfahren oder auch nachträgliche Bildrekonstruktion angehoben werden.

11.1.4 Beobachtung

Die konfokale Rastermikroskopie ist ein serielles Verfahren und hat als solches natürlich einen entscheidenden Nachteil – eine lange Messzeit. Ein Bildausschnitt von 1 mm^2 enthält bei $1 \mu\text{m}^2$ großen Pixeln 1 Mio. Bildpunkte. Diese werden in der konventionellen, parallelen Mikroskopie gleichzeitig, in der konfokalen (seriellen) Mikroskopie nacheinander aufgenommen. Um das Problem der langen Messzeit wenigstens zu mildern, sind in der konfokalen Mikroskopie verschiedene Ansätze entwickelt worden.

Beam Scanning. Die Abrasterung des Objektfeldes kann durch die Objektverschiebung erfolgen oder aber zur Verringerung der Messzeit durch

Strahlablenkung. In einer mechanischen Lösung wird das aufgeweitete Laserbündel von einem galvanisch ausgelenkten Scan-Spiegel periodisch abgelenkt (Galvanometerscanner). Die Winkelbewegung wird von einem telezentrischen System T in die Eintrittspupille eines Mikroskopobjektivs übertragen – und von dort schließlich in eine lineare Bewegung des Fokus über das Objekt. Mit zwei Scan-Spiegeln kann das Objekt zweidimensional gerastert werden [3]. Der Galvanometerscanner wird weit unterhalb seiner Resonanzfrequenz betrieben, um Verzeichnungen zu vermeiden. Die Bildaufbauzeit liegt im Sekundenbereich; kürzere Zeiten lassen sich erreichen, indem spezielle Galvanometerscanner im Resonanzfall betrieben werden. Anwendungen finden wir bei der Vermessung der Retina.

Die Ablenkung des Laserbündels muss nicht mechanisch erfolgen. In einem anderen Ansatz werden akustooptische Modulatoren (AOMs) eingesetzt, wo eine Schallwelle in einem Festkörper eine Dichtemodulation und damit eine Brechungszahlmodulation erzeugt. An diesem Phasengitter wird ein einfalldendes Laserbündel gebeugt, wobei der Ablenkwinkel von der Frequenz der Schallwelle abhängt.

Parallele Datenerfassung mit der Nipkow-Disk. Ein Zeitvorteil bei der Aufnahme eines kompletten Bildes ergibt sich, wenn mehrere Objektpunkte gleichzeitig abgebildet werden. Dazu kann die Punktlichtquelle durch eine rotierende Lochscheibe (Nipkow-Scheibe) in der Zwischenbildebene ersetzt werden, die flächenhaft mit einer inkohärenten Lichtquelle beleuchtet wird. Bei der Nipkow-Scheibe handelt es sich um eine Lochscheibe, bei der sich auf mehreren spiralförmigen Bahnen $10\text{ }\mu\text{m}$ große Pinholes befinden (Abb. 11.5 und [5]). (Sie wurde erstmals 1884 von P. Nipkow für die erste Kamera zur elektrischen Übertragung von Bildern benutzt.) Durch die Beleuchtung wird das rotierende Punktraster auf die Oberfläche projiziert und jeder Punkt in der Fokusebene überstrichen. Das vom Objekt reflektierte Licht trifft wieder auf die jeweilige Lochblende und gelangt über einen Strahlteiler auf eine CCD-Camera, die als Detektor eingesetzt wird.

Bei diesem Aufbau ist das wesentliche Problem das an der Lochscheibe reflektierte Licht (photolithographisch hergestellt handelt es sich im Wesentlichen um eine Chromglasmaske). Eine einfache Methode, direkte Reflexe zu vermeiden, ist, die Platte schräg zu stellen. Weitergehende Entkopplungen des von Scheibe und Objekt reflektierten Lichts werden durch polarisationsoptische Effekte erreicht.

Mit diesem Verfahren lässt sich ein kompletter Höhenschnitt im Videotakt gewinnen. Um dies zu ermöglichen, ist die CCD-Kamera an ein digitales Bildverarbeitungssystem angeschlossen. Zur Bestimmung der Topographie wird das Objekt rechnergesteuert axial verschoben und ein Stapel von Höhenschnittbildern erstellt – analog der Serie dünner Schnittpräparate in der konventionellen Mikroskopie. Im Rechner werden die Höhenschnitte gespeichert und aus diesen Daten mittels geeigneter Software die 3D-Topographie rekon-

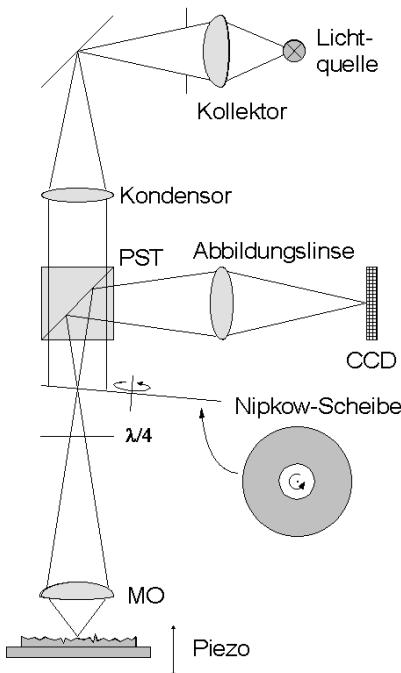


Abb. 11.5. Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit Nipkow-Scheibe

struiert. Mit dem konfokalen Verfahren lassen sich technische Objekte innerhalb weniger Sekunden mit einer Höhenauflösung von bis zu 15 nm bei einem Bildfeld von $< 1 \times 1$ mm vermessen. Die hohe Genauigkeit des Messverfahrens eröffnet ein großes Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten, in der Medizin aber auch in der Halbleiterindustrie und zur Materialforschung.

Konfokale Mikroskopie mit Mikrolinsen. Alternativ zu den Pinholes werden Mikrolinsen (brechend oder beugend) eingesetzt, wie Abb. 11.6 zeigt. Um die Topographie erfassen zu können ist eine Fokussierung erforderlich, d.h. die Objektebene wird in z -Richtung (Tiefe) mit Hilfe eines Piezoelements verschoben, die jeweiligen Bildschnitte werden ausgewertet und zu einem 3D-Bild zusammengefügt.

Anhand zahlreicher Messungen konnte gezeigt werden, dass es mit diesem Aufbau möglich ist, große Objektfelder (bis zu 30×30 mm) parallel zu vermessen. Dabei lassen sich Höhenauflösungen von besser als 100 nm erreichen [6, 7].

Die verwendeten Mikrolinsen besitzen eine NA von 0,29, einen Durchmesser von $150 \mu\text{m}$ und eine Brennweite von $250 \mu\text{m}$. Das reflektierte Bündel wird von der Abbildungslinse auf ein Pinhole fokussiert und schließlich auf einer CCD abgebildet.

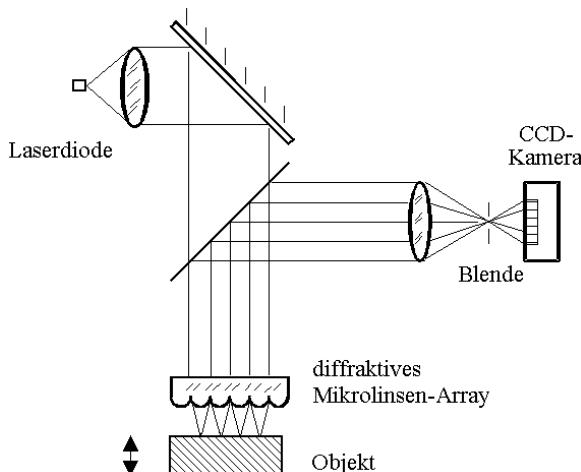


Abb. 11.6. Konfokaler Mikrolinsenaufbau

Auf der CCD entsteht das Bild der Mikrolinsen Pupillen. Damit wäre die laterale Auflösung auf den Mikrolinsendurchmesser beschränkt. Durch laterale Verschiebung des Objekts kann sie verbessert werden.

Die vertikale Auflösung folgt der gleichen Argumentation wie die konfokale Reflexionsmikroskopie mit einem Objektiv. Nur wirkt die Kombination aus Abbildungslinse und Mikrolinsenarray wie viele parallel liegende Objektive.

Während bei der Verwendung der Nipkow-Disk ein Objektiv und viele Pinholes verwendet wurden, werden hier viele Objektive und ein Pinhole verwendet. Damit ist das nutzbare Objektfeld nicht mehr durch das Gesichtsfeld des Objektivs begrenzt. Ein Abbildungsbeispiel zeigt Abb. 11.7 Beispieldhaft

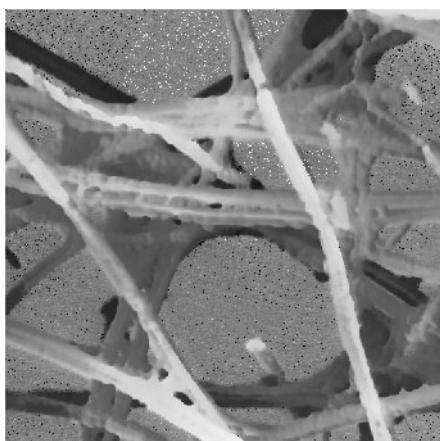


Abb. 11.7. Höhenkodiertes Grauwertbild einer Papierprobe

ist ein höhenkodiertes Grauwertbild einer Papierprobe gezeigt. Deutlich sind einzelne Fasern sichtbar.

Literatur

1. Born M, Wolf E (1980) Principles of optics. 6th edn. Pergamon-Press, Oxford New York, pp. 440
2. Bouwhuis G, Braat J, Huijser A, Pasman J, van Rosmalen G, Schouhamer K, Immink (1985) Principles of optical disc-systems. Adam Hilger, Bristol
3. Hellmuth T (1993) Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie. Physikalische Blätter 49:489–49
4. Isailovic J (1985) Videodisc and optical memory-systems. Prentice Hall, Englewood Cliffs
5. Masters BR, Kino GS (1993) Charge-coupled devices for quantitative Nipkow disk real-time scanning confocal microscopy. In: Shotton D (ed) Electronic Light Microscopy. Wiley-Liss, New York, pp. 315–327
6. Tiziani HJ and Uhde HM (1994) Three-dimensional analysis by a microlens-array confocal arrangement. Appl Optics 33:567–572
7. Tiziani HJ, Achi R, Krämer N, Wiegers L (1996) Theoretical analysis of confocal microscopy with microslenses. Appl Optics 35:120–125
8. Wilson I (1990) Confocal microscopy. Academic Press, London

12 Holographie und holographische Interferometrie

H. Tiziani

Die Holographie basiert auf der Überlagerung von Wellenfeldern vom Objekt und einer Referenzwelle. Dadurch erreichen wir die „Ganzaufzeichnung“ von Amplitude und Phase (holos = ganz; Graphie = Aufzeichnung). Bei der Rekonstruktion kann eine quasi dreidimensionale Wiedergabe erfolgen. Die Anwendungen sind vielfältig:

- 3D-Display,
- Werbung,
- Computerholographie,
- holographische Filter,
- holographische Interferometrie.

Die holographische Interferometrie ermöglicht es, kleinste Änderungen von Zuständen durch Belastung, Bewegung, Verformungen und Schwingungen zu vermessen. Dies erfolgt durch Vergleich von Wellenfeldern vor und nach der Verformung wie beispielsweise zum Auffinden von Schwachstellen bei Implantaten in der Medizin. So wird beispielsweise ein Hologramm vor und eines nach der Verformung registriert. Beide werden gemeinsam rekonstruiert. Zwischen den beiden Aufnahmen aufgetretene Verformungen resultieren bei der Rekonstruktion als Interferenzstreifenmuster.

Die Verfahren werden eingesetzt zur Optimierung der Konstruktionen [5] sowie beispielsweise beim Einsatz künstlicher Gelenke, aber auch zur Schwingungsanalyse. Holographische Interferometrie wird in der Automobilindustrie aber auch zur Serienprüfung von Reifen angewandt, insbesondere erfolgt die holographische Reifenprüfung in der Flugzeugindustrie.

12.1 Aufzeichnung, Speicherung und Rekonstruktion des Hologramms

12.1.1 Aufzeichnung des Hologramms

Dem Objektwellenfeld U_0 , welches durch Beugung des Lichts am Objekt entsteht, wird eine Vergleichs- oder Referenzwelle U_R überlagert. Die Referenzwelle muss dieselbe Frequenz v wie das Objektwellenfeld aufweisen und zu diesem kohärent sein (zeitliche und räumliche Kohärenz sind notwendige Bedingungen). Die Amplitude des Gesamtfeldes ist dann die Summe der beiden komplexen Amplituden, welche anhand des entstehenden stationären Interferenzmusters gespeichert werden kann (Abb. 12.1a).

Objektwelle:

$$U_0(\mathbf{x}) = A_0(\mathbf{x}) e^{-i\phi_0(\mathbf{x})}, \quad (12.1)$$

Referenzwelle:

$$U_R(\mathbf{x}) = A_R(\mathbf{x}) e^{-i\phi_R(\mathbf{x})}, \quad (12.2)$$

Superposition:

$$u(\mathbf{x}) = U_R(\mathbf{x}) + U_0(\mathbf{x}), \quad (12.3)$$

Intensität:

$$\begin{aligned} I(\mathbf{x}) &= |u(\mathbf{x})|^2 \\ &= \left| A_0(\mathbf{x}) e^{-i\phi_0(\mathbf{x})} + A_R(\mathbf{x}) e^{-i\phi_R(\mathbf{x})} \right|^2 \\ &= A_0^2(\mathbf{x}) + A_R^2(\mathbf{x}) + 2A_0^2(\mathbf{x})A_R^2(\mathbf{x}) \cos [\phi_0(\mathbf{x}) - \phi_R(\mathbf{x})]. \end{aligned} \quad (12.4)$$

Die Belichtung setzt sich dann aus einer konstanten Grundhelligkeit und einem zu U_o proportionalen Anteil zusammen. Bei einer passenden Wahl der Belichtungszeit kann der Arbeitspunkt in die Nähe des Wendepunkts der Amplitudentransmissionskurve gebracht werden. $\frac{U_o}{U_R}$ wird für praktische Fälle 1/3–1/10 gewählt.

Im geradlinigen Teil der Transmissionskurve, in der Umgebung des Arbeitspunkts, kann diese durch die Tangente ersetzt werden, dann ist das Superpositionsge setz anwendbar. Die Amplitudentransmission wird somit

$$T(\mathbf{x}) = T_0 + \tau \beta \{ U_R(\mathbf{x}) U_0^*(\mathbf{x}) + U_R^*(\mathbf{x}) U_0(\mathbf{x}) \}. \quad (12.5)$$

T_0 , β sind Konstanten; τ ist die Belichtungszeit.

12.1.2 Rekonstruktion des Hologramms

Die Amplitude unmittelbar nach dem Hologramm wird

$$\begin{aligned} A(\mathbf{x}) &= U_R(\mathbf{x}) T(\mathbf{x}) \\ &= U_R(\mathbf{x}) T_0(\mathbf{x}) + \text{const. } \tilde{I}(\mathbf{x}) U_R(\mathbf{x}) \\ &= U_R(\mathbf{x}) T_0(\mathbf{x}) + U_R(\mathbf{x}) \{ U_R(\mathbf{x}) U_0^*(\mathbf{x}) + U_R^*(\mathbf{x}) U_0(\mathbf{x}) \}. \end{aligned} \quad (12.6)$$

Wir setzen voraus, dass die Hologrammplatte mit einer ebenen Referenz- und Rekonstruktionswelle mit Einfallsinkel θ beleuchtet wird, nämlich

$$U_R = |U_R| e^{-i\frac{2\pi}{\lambda} x \sin \theta} \quad (12.7)$$

sowie einer Objektwellenfront Σ_0 auf dem Hologramm

$$U_0 = |U_0(\mathbf{x})| e^{-i\phi_0(\mathbf{x})}, \quad (12.8)$$

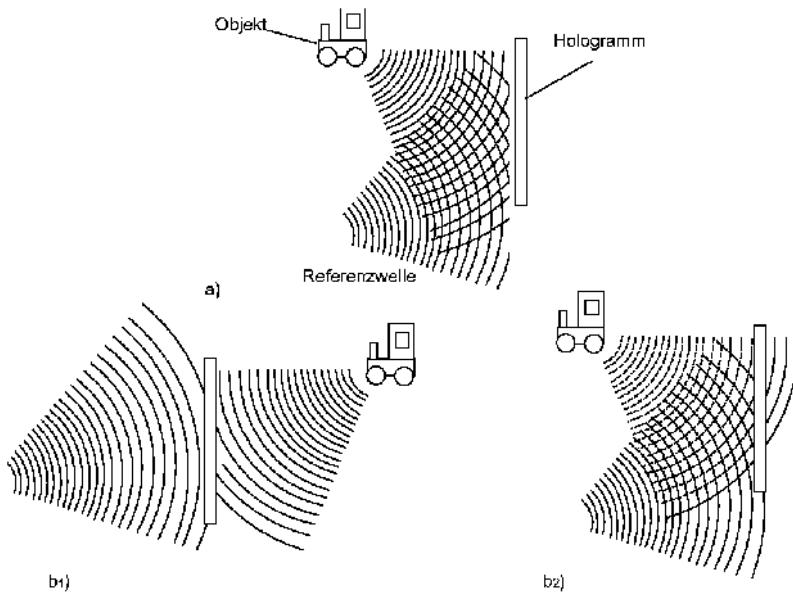


Abb. 12.1. (a) Aufnahme (b1) Rekonstruktion: reelles Bild (b2) Rekonstruktion: virtuelles Bild

sodass

$$A(\mathbf{x}) = T_0(\mathbf{x}) \exp \left[\frac{-i2\pi}{\lambda} x \sin \theta \right] \times |U_R|^2 |U_0| \exp \left[\frac{-i4\pi}{\lambda} x \sin \theta + \phi_0 \right] |U_R|^2 |U_0| \exp [-i\phi_0]. \quad (12.9)$$

Es fällt auf, dass die drei Wellenfronten die Hologrammplatte in unterschiedlichen Richtungen verlassen (Abb. 12.1b1 und b2). Da T_0 keine Phaseninformation enthält, entstehen zwei Bilder.

12.1.3 Holographische Interferometrie

In allen klassischen Interferometern interferieren zwei von derselben Lichtquelle ausgehende Wellen miteinander, die im gleichen Augenblick ausgestrahlt werden. Mit Hilfe der Holographie können Wellenfronten zeitlich nacheinander gespeichert werden. Auf demselben Hologramm können mehrere kohärente Wellenfronten beliebiger Gestalt registriert werden, die zu verschiedenen Zeiten unter verschiedenen Bedingungen auftreten. Bei der Rekonstruktion werden alle diese Wellenfronten gleichzeitig rekonstruiert und interferieren miteinander. Daraus ergeben sich interessante Anwendungsmöglichkeiten für die Präzisionsmesstechnik, wo kleine Deformationen gemessen werden.

Hauptvorteile der holographischen gegenüber der klassischen Interferometrie:

- Die Wellenfelder dreidimensionaler Oberflächen können zeitlich nacheinander gespeichert und anschließend gemeinsam rekonstruiert werden.
- Die Technik ist bei optischen, rauen Oberflächen vorzugsweise anwendbar.
- Es können wesentlich größere Objekte mit vertretbarem Aufwand untersucht werden.

Die zur Zeit üblichen Verfahren der holographischen Interferometrie lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- *Doppelbelichtungsholographie*: Zwei Belichtungen vor und nach der Beanspruchung des Objekts werden auf der gleichen photographischen Schicht registriert.
- *Echtzeitholographie*: Nach der ersten Belichtung des Hologramms wird die Photoplatte entwickelt und sehr genau in die ursprüngliche Position des Experimentieraufbaus gebracht. Das Objekt wird nun durch das Hologramm beobachtet. Änderungen des Objekts erscheinen als Interferenzstreifen.
- *Zeitmittelholographie zur Schwingungsmessung*: Das Hologramm wird während einer Anzahl harmonischer Schwingungen des Objekts registriert. Knotenlinien tragen dabei wesentlich mehr Information zum Interferenzbild (Hologramm) bei als sich bewegende. Doppelpulstechniken bieten sich insbesondere bei nichtharmonischen Schwingungen an.

Doppelbelichtungsholographie. Das Grundexperiment besteht darin, dass das zu untersuchende Objekt im spannungsfreien Zustand im Auflicht holographisch aufgenommen wird, die Belichtung wird aber nach der halben Gesamtbelichtungszeit unterbrochen. Danach unterwirft man das Werkstück den Kräften, deren verformende Wirkung gemessen werden soll, und beendet die Belichtung. Man überlagert auf diese Weise zwei Hologramme auf derselben Platte, deren rekonstruierte Wellenfronten sich aufgrund der Verformung geringfügig unterscheiden und makroskopische Interferenzen erzeugen. Bei der Überlagerung von zwei Wellenfronten, wobei zwischen den beiden Belichtungen eine geringfügige Änderung auftreten kann, seien U_0 und \bar{U}_0 die Wellenfronten des Objekts bei der ersten bzw. zweiten Belichtung.

Auf der Photoplatte erhalten wir die Summe der Amplitudenquadrate der beiden Belichtungen, nämlich den Ausdruck (12.10). Wird der Speicher (Photoplatte) entwickelt und mit einer zur Referenzwelle U_R identischen Welle beleuchtet, so ist die Rekonstruktion durch (12.11) gegeben.

Wir betrachten nun die zwei dreidimensionalen Bilder von U_0 und \bar{U}_0 des Objekts, die kohärent überlagert werden. Sie interferieren miteinander und erzeugen Streifen gleicher Verschiebung oder Deformation. Allerdings sind

die Änderungen der Wellenfronten gering, im Maximum einige Wellenlängen, sodass der Beobachter keine Doppelbilder sehen kann.

Betrachten wir nun den uns interessierenden Summanden etwas näher und verzichten wir zusätzlich auf Konstanten. Schreiben wir

$$\bar{U}_0(\mathbf{x}) = |U_0| e^{-i\bar{\phi}}, \quad (12.10)$$

dann wird

$$|U_R|^2 |U_0| \left\{ e^{-i\phi} + e^{-i\bar{\phi}} \right\}, \quad (12.11)$$

und die Intensität wird

$$2 |U_R|^4 |U_0|^2 \{ 1 + \cos(\phi - \bar{\phi}) \}, \quad (12.12)$$

d.h. jede Änderung von U_0 , die sich zwischen den Belichtungen abspielt, zeigt sich als Interferenzbild bei der Rekonstruktion.

Das Interferenzstreifensystem enthält die Information über die Verformung, die entsprechende Auswertung gestattet deren quantitative Bestimmung.

Echtzeitholographie. Wird das entwickelte Hologramm wieder genau in seine ursprüngliche Lage zurückjustiert, so deckt sich das virtuelle, holographische Bild vollkommen mit dem Original; beide Wellenfronten U_0 und \bar{U}_0 fallen zusammen. Werden dann kleine Eingriffe am Objekt vorgenommen, z.B. Verformung durch Belastung oder Erwärmung, so treten Abweichungen von der im Hologramm „eingefrorenen“ Wellenfront auf, sodass das auftretende Interferenzstreifensystem kleine Verformungen anzeigt.

Die Positionierung des Speichers (Photoplatte) auf Bruchteile der Wellenlänge ist schwierig. Auch stört die beim Entwicklungsprozess auftretende Schrumpfung der Emulsion bereits.

Vorteile: Gegebenenfalls können Bewegungen des ganzen Objekts örtlich kompensiert werden, um kleine Verformungen zu analysieren.

Holographie mit photorefraktivem Speicher. Als Speichermaterial in der holographischen Interferometrie werden häufig Photothermoplaste, photorefraktive Kristalle, Photopolymere und in jüngster Zeit direkte CCD eingesetzt. Die automatische Streifenauswertung ist ebenfalls schon seit einiger Zeit etabliert. Vorzugsweise wird das Phasenschiebeverfahren benutzt, obwohl das Heterodynverfahren bessere Auflösung liefern kann, dessen Realisierung allerdings aufwendiger ist.

Ein Aufbau mit photorefraktivem Speicher ist schematisch in Abb. 12.2 ersichtlich. Ein photorefraktiver Kristall, z.B. $\text{Bi}_{12}\text{SiO}_{20}$ (Wismut-Silizium-Oxid, BSO), dient als holographischer Speicher, auf dem das Objekt mit der

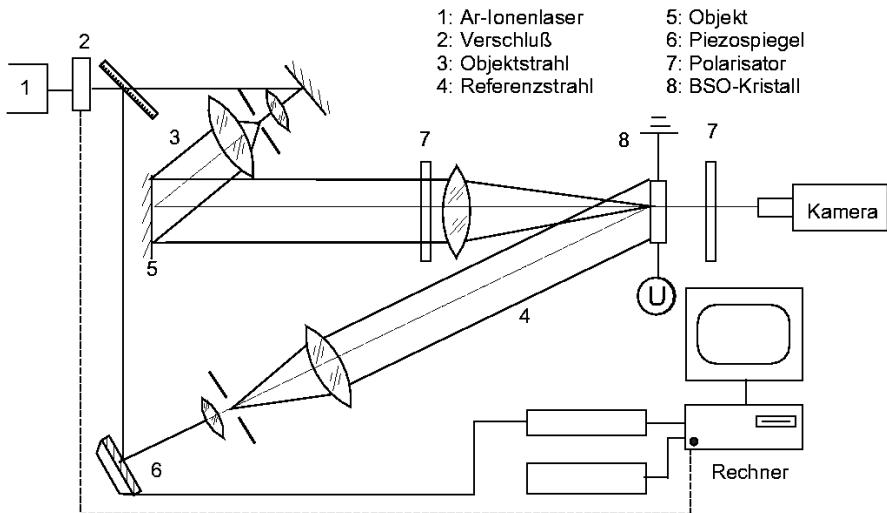


Abb. 12.2. Holographie mit photorefraktivem Speicher

Referenzwelle überlagert wird. Obwohl heute schon thermoplastische Materialien anstelle der klassischen, auf der Basis von Silberhalogeniden arbeitenden Emulsionen, eingesetzt werden, sind photorefraktive Kristalle eine Alternative. Sie basieren auf dem elektrooptischen Effekt, nachdem eine Helligkeitsvariation in eine entsprechenden Ladungsverteilung bzw. Brechzahlvariation gewandelt wird. Das Hologramm kann in Bruchteilen von Sekunden gespeichert und gelöscht werden; die Löschung erfolgt durch Ausgleich der Ladungen, z.B. durch Lichtblitze. Das Auslesen mit der Aufnahmewellenlänge löscht die Information nach einer bestimmten Zeit wieder vollständig [4, 8].

Im Referenzstrahl in Abb. 12.2 ist für die Streifenauswertung eine rechnergesteuerte Phasenschiebeeinheit skizziert – ein mit Piezoelement verstellbarer Spiegel – der die stufenweise eingeführten Phasenänderungen implementiert. Für eine sich zeitlich ändernde Verformung kann in Intervallen die Verformung automatisch ausgewertet werden. Vor jedem Intervall wird der Speicher gelöscht. Die Änderung wird registriert durch zweimaliges Belichten vor und nach der Verformung; das Streifenmuster wird jeweils mit der zweiten Belichtung automatisch ausgelesen und ausgewertet [4, 8]. Der Kristall wird für die nächste Aufnahme mit Lichtblitz wieder gelöscht.

Digitale Holographie. Durch die Verfügbarkeit von hochauflösenden Detektorarrays (CCD mit 1024×1024 Pixel) wird die digitale Holographie für die Messtechnik interessant. Die Leistungsfähigkeit sowohl der Computer als auch der CCD-Kameras und Bildspeicher wird laufend verbessert.

Das Hologramm (bzw. Specklemuster) als physikalische Überlagerung von Objekt und Referenzwelle wird mit Hilfe der CCD-Kamera registriert. Damit

wird auch die Phase festgehalten. Die Rekonstruktion erfolgt aber digital mit Hilfe des Rechners. Dies ermöglicht die räumliche Darstellung des Objekts. Durch entsprechende Verfahren mit pixelweise adressierten Flüssigkeitskristallen kann die simulierte 3D-Information auch physikalisch aufgezeichnet werden.

Verformungen drücken sich überwiegend in der Änderung der Phase aus. Holographische Interferometrie ist demnach digital ohne physikalische Rekonstruktion möglich [6].

Literatur

1. Breuckmann B and Thieme W (1985) Computer-aided analysis of holographic interferograms using the phase-shift method. *Appl Opt* 24:2145–2149
2. Creath K (1985) Phase shifting speckle interferometry. *Appl Opt* 24:4053–3058
3. Erf RK (ed) (1978) Speckle metrology. Academic Press, New York
4. Huignard JP, Herriau JP, Aubourg P, Spitz E (1971) Phase-conjugate wavefront generation via real-time holography in $B_{12}SiO_{20}$ crystals. *Opt Lett* 4:21–23
5. Jones R and Wykes C (1983) Holographic and speckle interferometry. Cambridge University Press, Cambirdge New York
6. Pedrini G, Tiziani HJ (1997) Digital double pulse-TV-holography. *Optics and Laser in Engineering* 26:199–219
7. Schumann W and Dubois M (1975) Holographic interferometry. Springer Series in Optical Sciences, vol 16. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
8. Tiziani HJ (1982) Realtime metrology with BSO crystals. *Optic Acta* 29:463–470

13 Optische Interferometrie

H. Tiziani

Die Interferometrie ist vielseitig einsetzbar, sie ist auch ein wichtiges und vielseitiges Werkzeug für die Präzisionsmesstechnik geworden. Dazu haben die Entwicklung des Lasers als kohärente Lichtquelle und die Methoden der automatischen Streifenauswertung wesentlich beigetragen. Sie tragen einen entscheidenden Anteil am Erfolg im industriellen Einsatz der Verfahren. Hochauflösende CCD-Arrays, aber auch die rasante Entwicklung von leistungsfähigen Kleinrechnern machen den Einsatz der laser-optischen Verfahren attraktiv.

Interferometrische Verfahren sind einsetzbar zur hochgenauen Streckenvermessung bzw. der Messung von Verschiebungen bis 50 m und zur Mikrostrukturvermessung mit Auflösungen im Bereich von Nanometern und besser. Interferometrie bietet sich auch zur Qualitätssicherung und Oberflächenvermessung an, aber auch in der Spektroskopie und zur Geschwindigkeitsmessung [8, 10].

Die Interferometrie ist nicht auf den sichtbaren Spektralbereich (380 nm $\leq \lambda \leq$ 780 nm) beschränkt; so dient die Radiowelleninterferometrie zur Bestimmung der Radioquellen im Weltraum oder die Neutroneninterferometrie zur Messung von Kristallgittern.

Im Folgenden werden die Grundlagen der optischen Interferometrie zusammen mit den Grundprinzipien dargestellt. Dabei stehen die interferometrische Flächenprüfung mit automatischer Streifenauswertung und die Längenvermessung im Vordergrund.

13.1 Grundbegriffe der Interferometrie

Die Interferometrie basiert auf den Welleneigenschaften des Lichts. Bei der Überlagerung zweier Wellenzüge entsteht ein Minimum, wenn sie in Gegenphase, und ein Maximum, wenn sie phasengleich sind. Voraussetzung für die Interferenz ist allerdings die Kohärenz (zeitlich, räumlich). So ist eine Kohärenzlänge erforderlich, die größer ist als der optische Wegunterschied der Teilwellen [1, 8–11].

13.1.1 Linienbreite der Lichtquelle und Kohärenzlänge

Die für die Interferometrie erforderlichen Kohärenzeigenschaften werden kurz zusammengefasst. Die Fourier-Transformation der spektralen Energieverteilung

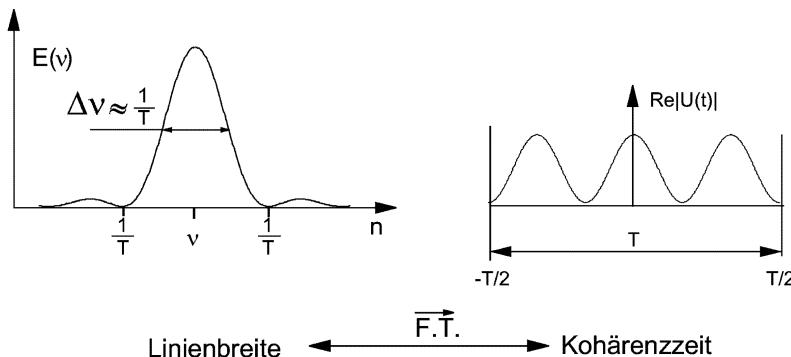


Abb. 13.1. Zusammenhang zwischen Linienbreite und Kohärenzzeit

lung der Lichtquelle führt zur Kohärenzzeit. Das Produkt der Kohärenzzeit mit der Lichtgeschwindigkeit c führt zur *Kohärenzlänge* L .

Vielfach wird die Halbwertsbreite Δv als Linienbreite gewählt (Abb. 13.1). Die Kohärenzlänge

$$L = c \cdot T = \left| \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \right|$$

folgt aus

$$T = \frac{1}{\Delta v}; \quad \lambda = \frac{c}{v}; \quad \Delta\lambda = \frac{\lambda^2}{c} \cdot \Delta v.$$

Sobald die optische Weglängendifferenz der beiden Teilstrahlengänge gleich oder größer ist als die Kohärenzlänge, sind keine Interferenzstreifen sichtbar. Die Interferenzstreifen sind am kontrastreichsten, wenn der optische Weg oder Gangunterschied gleich Null ist. Die Kohärenzlängen einiger Lichtquellen sind in Tabelle 13.1 aufgelistet.

Tabelle 13.1. Kohärenzlängen einiger Lichtquellen

Lichtquelle	Kohärenzlänge
Glühlicht unzerlegt	2,5 μm
Hg-Höchstdrucklampe	20 μm
$\lambda = 546$ nm (Linie durch Interferenzfilter isoliert)	
Hg-Niederdrucklampe	6 cm
$\lambda = 546$ nm (Linie durch Interferenzfilter isoliert) (abhängig von Stromstärke und Druck)	
Kr-Isotopenlampe (Krypton 86 bei 60 K, $\lambda = 606$ nm) zur Meterdefinition, 1960	60–80 cm
HeNe-Laser 1 m Resonatorlänge	20 cm
HeNe-Laser (stabilisiert, 1 Longitudinalmode)	> 50 m

13.1.2 Räumliche Kohärenz

Neben der zeitlichen Kohärenz muss besonders bei thermischen Lichtquellen die räumliche Kohärenz berücksichtigt werden. Bei der thermischen Lichtquelle kann jedes Atom als Ursprung einer unabhängigen Lichtwelle betrachtet werden. Die räumliche Ausdehnung der Lichtquelle muss deshalb so klein sein, weil der optische Wegunterschied zwischen den Wellen vom Rand und der Mitte der Lichtquelle im Interferometer kleiner oder gleich $\lambda/4$ ist; λ ist die Wellenlänge des verwendeten Lichts. Vielfach wird in Interferometern auch eine Blende als sekundäre Lichtquelle benutzt, deren Ausdehnung meistens kleiner ist als das darauf fokussierte Bild der Lichtquelle, sodass sie die räumliche Kohärenz bestimmt. Bei zu kleiner Blende wird der durchtretende Lichtfluss zu klein. Lochblenden im Brennpunkt einer Linse dienen auch beim Laser zur Verbesserung der Wellenfront (Strahlqualität).

Für die in der Interferometrie benutzten Laser sind sowohl die zeitliche als auch besonders die räumliche Kohärenz gegeben und für die folgende Betrachtung vorausgesetzt.

13.1.3 Zweistrahlinterferenz

Es gibt verschiedene Verfahren der Wellenaufteilung, basierend auf der Amplitudenteilung oder der Wellenteilung. In Abb. 13.5 wird die einfallende, ebene Wellenfront am Strahlteiler S aufgeteilt in die Teilwellen 1 und 2. Sie werden nach den Reflexionen an den Spiegeln M1 und M2 wieder vereinigt und interferieren, wenn die Kohärenzlänge größer ist als der optische Wegunterschied nd . Beobachtet wird der zeitlich quadratische Mittelwert der Amplitude in der Ebene x, y ,

$$I(x, y) = \frac{1}{T} \int_0^T |a_1(x, y) \cos(\omega t + \phi_1(x, y)) + a_2(x, y) \cos(\omega t + \phi_2(x, y))|^2 dt.$$

Abgesehen von einem konstanten Faktor ergibt sich die Intensität auf einer Photoplatte oder einem Photodetektor (bei perfekter Kohärenz ist γ_{21} , der Kohärenzgrad ist 1):

$$I(x, y) = |a_1(x, y)|^2 + |a_2(x, y)|^2 + 2|a_1(x, y)| |a_2(x, y)| \gamma_{21} \{ \cos(\phi_2(x, y) - \phi_1(x, y)) \}. \quad (13.1)$$

ϕ_1 und ϕ_2 sind die Phasen, a_1 und a_2 die Amplituden der Teilwellen. Das Interferenzmuster in einer Zweistrahlinterferenzanordnung kann auch geschrieben werden als

$$I(x, y) = I_0(x, y) \{ 1 + m(x, y) \cos \phi(x, y) \}. \quad (13.2)$$

Dabei stellt I_0 die mittlere Intensität $|a_1(x, y)|^2 + |a_2(x, y)|^2$ auf jedem Empfängerelement und

$$m(x, y) = \frac{2 |a_1(x, y)| \cdot |a_2(x, y)|}{|a_1(x, y)|^2 + |a_2(x, y)|^2}$$

den Kontrast (Modulation oder Sichtbarkeit) des Interferenzmusters dar, sein Maximum $m = 1$ wird nur für $|a_1| = |a_2|$ erreicht. Den Phasenterm erhält man aus

$$\phi(x, y) = \phi_1(x, y) - \phi_2(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \delta(x, y) \quad \text{bzw.} \quad \frac{2\pi}{\lambda} W(x, y),$$

wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts, δ die optische Wegänderung und W der optische Wegunterschied bezogen auf eine Referenzebene sind.

13.1.4 Zweistrahlinterferenzanordnungen

Es gibt verschiedene Zweistrahlinterferenzanordnungen – lediglich einige typische und sehr verbreitete werden hier vorgestellt. Grundsätzlich wird zwischen zwei Interferenzstreichensystemen unterschieden, nämlich

- Interferenzen gleicher Dicke (Fizeau) (kleine Lichtquelle),
- Interferenzen gleicher Neigung (Haidinger) (große Lichtquelle).

Bei verschiedenen Interferenzanordnungen kann entweder die eine oder andere Streifenart angetroffen werden. Bei parallel auf den Prüfling einfallenden Lichtstrahlen handelt es sich um Interferenzen gleicher Dicke.

Interferenz gleicher Dicke (Fizeau). Beleuchtung: Vielfach Planwelle. Am Beispiel der planparallelen Platte (Abb. 13.2) wird der optische Wegunterschied zwischen der an der Front- und Rückseite reflektierten Welle untersucht.

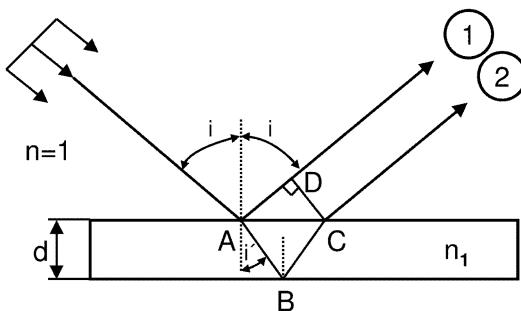


Abb. 13.2. Interferenz gleicher Dicke

Die optische Wegdifferenz zwischen der Welle 1 und 2 ist

$$\begin{aligned}\delta &= [ABC] - [AD], \\ \delta &= 2n_1 d \cos i', \\ \delta &= 2n_1 d, \quad \text{wenn } i = i' = 0.\end{aligned}\tag{13.3}$$

Achtung: Für $n_1 \geq n$ ergibt sich ein Phasensprung π an der Grenzschicht, welcher mit Hilfe der Fresnel-Gleichung nachgewiesen werden kann. Für die nachfolgenden Betrachtungen der Interferenzanwendung in der Messtechnik hat dies jedoch kaum Bedeutung.

Fizeau-Interferenzstreifen dienen speziell zur Prüfung der Oberflächenqualität (z.B. Halbleiterindustrie) von planparallelen Platten, Keilwinkeln (Streifen gleicher Dicke).

Interferenz gleicher Neigung (Haidinger-Ringe). Wird eine planparallele Platte mit dem Licht einer ausgedehnten Lichtquelle beleuchtet (s. Abb. 13.3), so hängt der Gangunterschied der an den beiden Flächen reflektierten Strahlen vom Einfallswinkel i' (13.3) ab. Durch die Interferenzbedingung $\delta = m \cdot \lambda$ ($m = 1, 2, \dots, M$) findet eine Selektion in unterschiedliche Richtungen statt. In der Brennebene einer Linse zeigen sich Linien gleicher Neigung, sog. Haidinger-Streifen (Abb. 13.3a). Eine andere Anordnung zur Erhaltung von Haidinger-Streifen zeigt Abb. 13.3b. Hier wird zur Beleuchtung der planparallelen Platte eine punktförmige Lichtquelle eingesetzt; die in unterschiedliche Richtungen reflektierten Strahlen können nun ohne Zusatzoptik direkt auf einem Schirm sichtbar gemacht werden. Auch hier zeigen sich Linien gleicher Neigung.

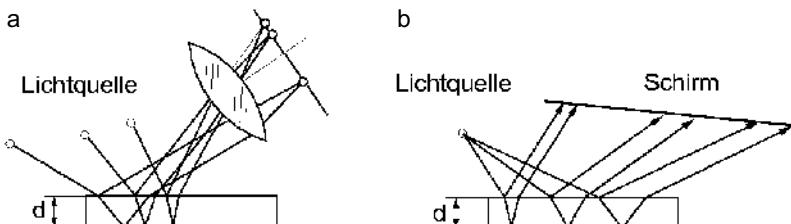


Abb. 13.3. Interferenz gleicher Neigung

13.2 Einige Interferenzanordnungen in der Messtechnik

13.2.1 Fizeau-Interferenzgerät

Mit dieser Anordnung wird der optische Wegunterschied zwischen Front- und Rückseite oder zwischen einer Referenzfläche und der Prüffläche gemessen (Abb. 13.4). Jedesmal, wenn $2 \cdot d \cdot n + \frac{\lambda}{2} = k\lambda$ ist, erscheint ein Interferenzstreifen.

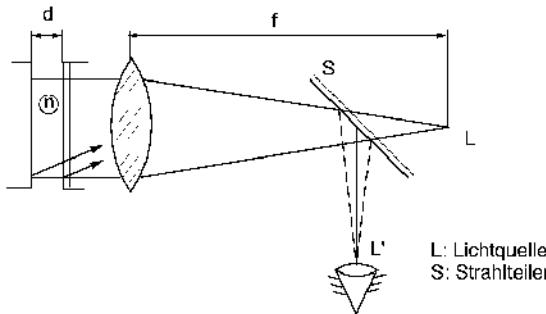


Abb. 13.4. Prinzip des Fizeau-Interferometers

Auf diese Weise können Unebenheiten und Dicken von Schichten, z.B. in der Halbleiterindustrie, gemessen werden. Der Intensitätsverlauf der Interferenzstreifen ist \cos^2 -förmig. Dadurch sind der visuellen Ablesegenauigkeit Grenzen gesetzt (rund 0,1 Streifenabstand). In der digitalen Interferometrie mit automatischer Streifenanalyse sind Auflösungen von 1/100 möglich. Zur Verbesserung der Genauigkeit können auch Mehrfachinterferenzenanordnungen Anwendung finden (Fabry-Perot).

13.2.2 Michelson-Anordnung

Die einfallende Planwelle wird mit Hilfe des Strahlteilers S in zwei Hälften aufgeteilt (Abb. 13.5). Die Welle (1) durchläuft den optischen Weg 1 und wird am Spiegel M_1 reflektiert, die Welle (2) wird vom Spiegel M_2 reflektiert.

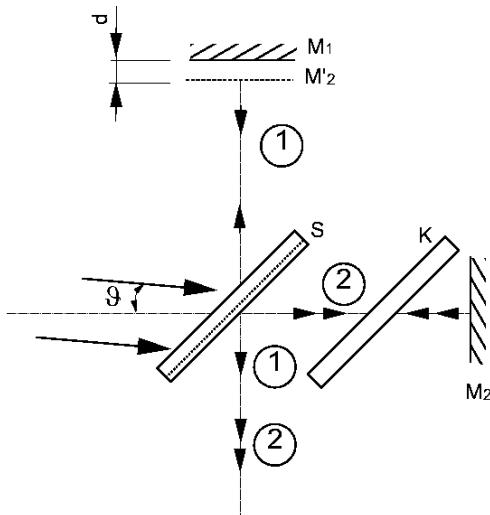


Abb. 13.5. Michelson-Anordnung

Nach dem Strahlteiler werden die beiden Wellen wieder vereinigt und interferieren. K ist eine Kompensationsplatte aus gleichem Glas mit gleicher Dicke wie S (\rightarrow gleiche optische Wege); sie wird für weißes Licht verwendet. Das Interferenzmuster ergibt sich nach (13.2). Der optische Wegunterschied für die Beleuchtungsrichtung ist $\delta = 2d \cos \vartheta$.

13.2.3 Twyman-Green-Interferometer

Dieses Interferometer gleicht dem Michelson-Interferometer. Die ausgedehnte Lichtquelle wird durch eine monochromatische Punktlichtquelle ersetzt. In unseren Anwendungen werden Streifen gleicher Dicke vermessen.

Der Strahlteiler S (halbverspiegelt) spaltet die durch die Linse L_1 erzeugte Planwelle in zwei Hälften auf (Abb. 13.6a). Nach der Reflexion an den Spiegeln M_1 bzw. M_2 werden die Wellenfronten nach dem Strahlteiler S wieder vereinigt und durch die Linse L_2 fokussiert. Das Auge bzw. das TV-System wird dann im Brennpunkt von L_2 plaziert. Die Intensität im Interferenzbild ist bestimmt durch den optischen Wegunterschied $[AM_1A]$ und $[AM_2A]$.

Diese Art von Interferenzanordnungen wird speziell zur Prüfung von optischen Komponenten, Glasplatten, Oberflächen, z.B. Wasseroberflächen, Prismen (Abb. 13.6b) sowie Linsensystemen in Verbindung mit einem Kugelspiegel (Abb. 13.6c) verwendet.

Laserinterferometrie in der Fertigung, aber auch für Anwendungen in der Biologie, nimmt an Bedeutung zu, eine Schwerpunktverlagerung ist zu erkennen, wonach der Messort von der Endkontrolle zur Fertigungsstelle verlegt wird.

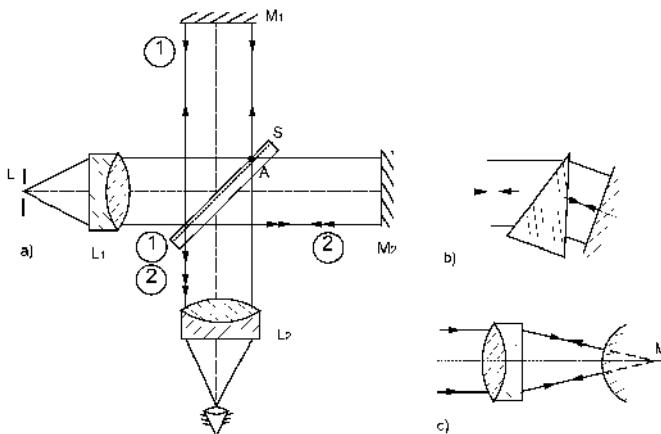


Abb. 13.6. Twyman-Green-Interferometer

13.2.4 Interferometrie in der Längenmessung

Das beschriebene Interferometerprinzip wird bei Längeninterferometern fast ausschließlich benutzt. Der Laserstrahl wird durch einen optischen Strahlteiler auf die zwei Interferometerarme verteilt; die an beiden Endspiegeln M_1 und M_2 reflektierten Bündel am Interferometerausgang werden auf einem Photodetektor (anstelle des Auges) registriert. Verschiebt man beispielsweise den Endspiegel M_2 , so wechseln am Interferometerausgang entsprechend der Phasenlage der beiden von M_1 und M_2 reflektierten Bündel Maxima und Minima der Intensität. Ein an den Detektor angeschlossener Zähler zählt die Anzahl der Hell-Dunkel-Wechsel. Damit werden Wegänderungen, aber auch Endmasse gemessen. Darauf basiert auch die Meterdefinition:

Am 14. Oktober 1960 wurde vom internationalen Büro für Maße und Gewichte das Metermaß als 1650763,73 Wellenlängen des beim Übergang zwischen den Niveaus $2p_{10}$ und $5d_s$ des Kryptonisotops mit der Massenzahl 86 emittierten Lichts definiert. In der Zwischenzeit stehen frequenzstabilisierte HeNe-Laser und Argon-Ionen-Laser mit großen Kohärenzlängen (bis zu einigen km) zur Verfügung. Darüber hinaus sind Frequenzmessungen die genauesten Messungen, die wir heute kennen. Da die Lichtgeschwindigkeit das Produkt aus Wellenlängen und Frequenz ist, kann bei Festlegung der Lichtgeschwindigkeit ein beliebiger frequenzstabilisierter Laser, dessen Frequenz bekannt ist, als Längennormal benutzt werden (Erweiterung der Meter-Definition 1983 für hochgenaue Bestimmung des Meters; ansonsten gilt die Definition von 1960).

13.2.5 Mach-Zehnder-Interferometer

Eine weitere wichtige Interferenzanordnung ist die von Mach-Zehnder (Abb. 13.7). Die Anordnung mit den getrennten Wellenfronten $[S_1, M_1, S_2]$ und $[S_1, M_2, S_2]$ ist sehr geeignet für Untersuchungen von Gasströmungen,

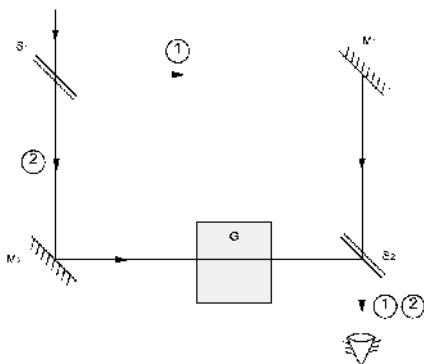


Abb. 13.7. Mach-Zehnder-Anordnung

Gasdrücken und von Luftströmungen bei Geschossen. Eventuell muss für den Behälter im Referenzstrahl 1 ein mit G identisches Gefäß angebracht werden.

13.2.6 Wellenfrontscherungsinterferometer

Die zu untersuchende Wellenfront wird verdoppelt (geschert). Dabei wird die Verdoppelung kleiner oder größer als die laterale Ausdehnung der Phasenstruktur gewählt. Wir interessieren uns hier speziell für den ersten Fall, z.B. für die Untersuchung einer Wellenfront (Wellenfrontabweichung, bezogen auf eine Referenzwellenfront, die eine Plan- oder Kugelwelle ist). Sie wird ausgedrückt als $W(x, y)$; x, y sind kartesische Koordinaten eines Punkts P der Wellenfront. Wird die Wellenfront in x -Richtung mit der ursprünglichen um s geschert, so wird die Koordinate des Punkts P zu $(x - s, y)$. Durch Überlagerung der beiden Wellenfronten resultiert im Punkt P : $W(x, y) + W(x - s, y)$. Bei lateral gescherten Interferenzanordnungen entsteht bei Überlagerung von $W(x, y)$ und $W(x - s, y)$ jeweils das Interferenzbild ΔW (Abb. 13.8). Keine Interferenzen werden beobachtet, wenn wir eine reine Planwelle scheren. Alternativ kann radial oder achsial geschert werden [8, 10].

Für kleine s können wir schreiben

$$\left(\frac{\partial W}{\partial x} \right) \cdot s = \Delta W.$$

Wir erhalten die Ableitung der Wellenfront, wenn $s \rightarrow 0$. Die einfachste Anordnung zur Beobachtung gescherter Interferenzen stellt die planparallele Platte dar (Abb. 13.9).

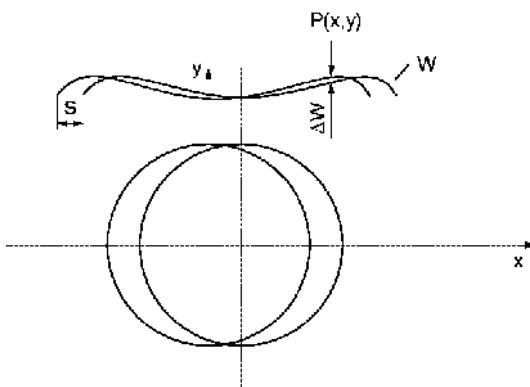


Abb. 13.8. Gescherte Wellenfronten

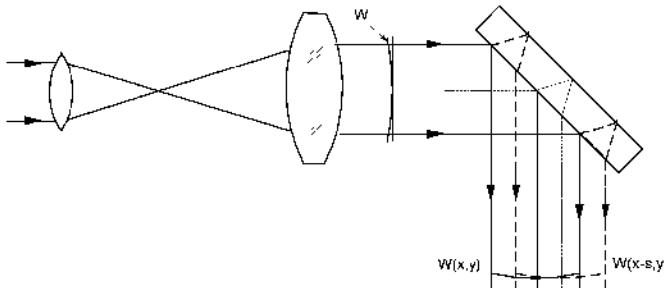


Abb. 13.9. Interferenzanordnung zur Scherung

13.3 Digitale interferometrische Messtechnik

Die Interferometrie wurde schon lange vor der Erfindung des Lasers eingesetzt. Nach Einführung des Lasers konnten die Einsatzmöglichkeiten jedoch erweitert werden, sodass sie heute zu den vielseitigsten Messverfahren der hochgenauen berührungslosen Messtechnik zählt. Schnelle und genaue elektro-optische Detektion der Interferenzstreifen haben zu interessanten industriellen Messverfahren geführt. Durch elektronische Bestimmung der optischen Interferenzphase kann die Empfindlichkeit und Messgenauigkeit auf Bruchteile der Wellenlänge des verwendeten Lichts gesteigert werden. Die digitale Interferometrie entwickelt sich zur Zeit immer mehr zu einem sehr nützlichen Werkzeug der hochgenauen berührungslosen Messtechnik für die Industrie.

Für die Streifenanalyse werden verschiedene Verfahren angewendet. Es kann zwischen statischen und dynamischen Verfahren unterschieden werden:

Unter *statischen* Methoden ist die Auswertung nur eines Interferogramms zu verstehen (keine Phasenschiebung). Bei statischen Methoden müssen in aller Regel geschlossene Streifen vermieden werden. Die Streifenmitten können auf verschiedene Arten gefunden werden. Zur Digitalisierung können ein Digitalisiertablett oder bekannte Video- und Bildverarbeitungsverfahren herangezogen werden. Zur Evaluation der Phase eignen sich auch Fourier-Transformationsverfahren [2] sowie Fourier-Analyseverfahren in Verbindung mit der Videotechnik.

Bei den *dynamischen* Verfahren wird die Phase zwischen dem Referenz- und Prüfarm variiert, und zwar entweder in Stufen oder kontinuierlich [12]. Hier ist zu unterscheiden zwischen

- Phase-shift- oder Phasenschiebeverfahren mit Phasenschiebungen in zwei, drei, vier oder mehr konstanten Stufen bzw. kontinuierlich (quasi Heterodyn-Verfahren),
- Heterodynverfahren und
- Phase-locked-Verfahren.

13.3.1 Phasenschiebeverfahren

Die Phasenschiebeverfahren sind am einfachsten zu realisieren. Es wird hier die Zweistrahlinferferometrie stellvertretend für die anderen Anwendungen beschrieben.

Das Interferenzmuster in einer Zweistrahlinferferenzanordnung kann, in Anlehnung an (13.2), beschrieben werden als

$$I(x, y) = I_0(x, y) \{1 + m(x, y) \cos [\phi(x, y) + \Delta]\}. \quad (13.4)$$

Δ ist die eingeführte Phasenschiebung.

Zur einfachen Auswertung sind mindestens drei Interferenzmuster mit den entsprechenden Phasenverschiebungen von beispielsweise 90° oder 120° zu speichern. Die Interferenzmuster werden häufig mit Hilfe von Festkörperdetektoren, z.B. CCD, Speicher und einem Personal-Computer (PC) analysiert. Bei Phasenschiebungen von je 90° ergeben sich die Intensitätsmuster wie folgt:

$$I_1(x, y) = I_0(x, y) \{1 + m(x, y) \cos \phi(x, y)\},$$

$$I_2(x, y) = I_0(x, y) \{1 - m(x, y) \sin \phi(x, y)\},$$

$$I_3(x, y) = I_0(x, y) \{1 - m(x, y) \cos \phi(x, y)\}.$$

Dabei sind I_1, I_2, I_3 die Intensitäten in den Punkten (x, y) bei entsprechender Phasenschiebung Δ . Daraus errechnet sich die Phase ϕ nach

$$\phi(x, y) = \arctan \frac{2I_2(x, y) - I_1(x, y) - I_3(x, y)}{I_3(x, y) - I_1(x, y)}. \quad (13.5)$$

Ähnliche Ausdrücke ergeben sich bei Phasenschiebungen von -90° , 0° und $+90^\circ$ bzw. von 0° , 120° und 240° [12].

Es ist an dieser Stelle zu bemerken, dass sich durch die Phasenschiebung nur das Interferenzstreifenmuster ändert, während sich die Strukturen des Bildhintergrundes nicht verändern. Das Phasenschiebeverfahren liefert folgende Vorteile:

- Das Vorzeichen der Phase ϕ wird eindeutig ermittelt.
- Die Phase ϕ kann auf 1/100 des Streifenabstands ermittelt werden.
- Interferenzstreifen können eindeutig vom Hintergrund getrennt werden.

Als Alternative zu dem stufenweise phasengeschenobenen Interferenzmuster kann die Phasenänderung auch aufsummiert werden, wobei die Integrationsstufen üblicherweise konstant sind. Der Detektor integriert die Streifenintensität bis zur Phasenschiebung γ ; γ kann dabei beliebig sein. Die integrierte Intensität ergibt sich zu

$$I_i(x, y) = \frac{1}{\gamma} \int_{\frac{\Delta_i - \gamma}{2}}^{\frac{\Delta_i + \gamma}{2}} I_0(x, y) \cdot \{1 + m(x, y) \cos [\phi(x, y) + \delta(t)]\} d\delta(t), \quad (13.6)$$

wobei ϕ die zu bestimmende Phase der Wellenfront, Δ_i die mittlere Phase für die Belichtung, I_0 die mittlere Intensität und m der Kontrast der Interferenzmuster sind. Nach Integration erhält man eine registrierte Intensität

$$I_i(x, y) = I_0(x, y) \cdot \left\{ 1 + m \frac{\sin\left(\frac{\gamma}{2}\right)}{\left(\frac{\gamma}{2}\right)} \cos[\phi(x, y) + \Delta_i] \right\}. \quad (13.7)$$

Die Methode nennt sich „Integrating Bucket“ [5]. Der Unterschied zwischen der Integrationsmethode und der stufenweisen Phasenschiebung liegt bei der Kontrastreduzierung der Interferenzstreifen. Für $\gamma = 0$ ist das die stufenweise Phasenverschiebung.

Um Diskontinuitäten zu vermeiden und das Sampling-Theorem von Nyquist zu berücksichtigen, sollte ein Interferenzstreifen mindestens zwei Detektorelemente überdecken.

Untersuchungen auch an unserem Institut haben gezeigt, dass die 4- und insbesondere die 5-Interferogramm-Methoden mit z.B. vier Phasenschiebungen von je 90° besonders unempfindlich auf Fehler der Phasenschiebung sind; beispielsweise führen Fehler von 20% zu Messfehlern in der Größenordnung einer zehntel Wellenlänge. Vorsicht ist am Platz, wenn Phasenschiebungen in stark konvergierenden oder divergierenden Wellenfronten wie z.B. bei der Fizeau-Anordnung nötig werden.

Die digitale Interferometrie erlaubt die sehr genaue Bestimmung der Wellenfront aus vorliegenden Interferenzstreifen. Sowohl das Phasenbild als auch der Streifenkontrast können dargestellt werden. Nachdem die Daten im Rechner sind, können Polynome angepasst werden. Zernike-Polynome sind wegen ihrer orthogonalen Eigenschaften besonders nützlich zur Untersuchung von Justierfehlereinflüssen und zur Festlegung von Toleranzkriterien [4, 7].

Abbildung 13.10 zeigt schematisch die Anordnung eines Twyman-Green-Interferometers zur Untersuchung des optischen Systems OBJ mit perfek-

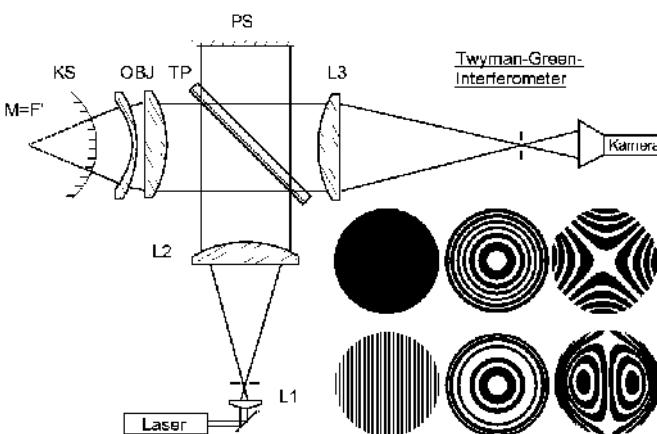


Abb. 13.10. Twyman-Green-Interferometer mit typischen Interferenzmustern

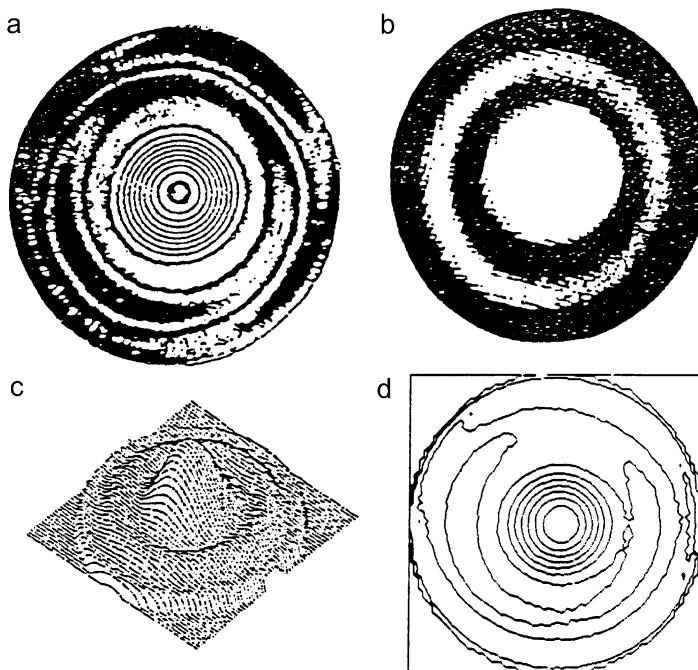


Abb. 13.11. Automatische Interferenzstreifenanalyse. (a) Interferogramm (b) Grauwertdarstellung (c) Pseudo-3D-Darstellung (d) Konturlinien

tem Kugelspiegel KS mit dem Kugelmittelpunkt M im Brennpunkt F' vom OBJ zusammen mit typischen Bildfehlern, die automatisch analysiert werden können. Die Phasenschiebung erfolgt hier mit Hilfe des Piezospiegels PS im Referenzarm: Für die Oberflächenuntersuchung von KS mit Hilfe eines Twyman-Green-Interferometers wird das OBJ als perfekt vorausgesetzt. Abbildung 13.11 veranschaulicht das Ergebnis der Anwendung der digitalen Interferometrie zur Untersuchung der Fehler einer Kugeloberfläche.

13.3.2 Anwendung der Interferenzmethoden in der Mikroskopie

Ein typischer Vertreter einer Mireau-Anordnung ist in Abb. 13.12 skizziert. Im Referenz- und Prüfarm sind nahezu identische Objektive erforderlich. Das Interferenzbild erscheint in der Nähe der Prüflingsoberfläche und wird somit in die Zwischenbildebene abgebildet. Dort befindet sich auch der Detektor, z.B. CCD-Zeile oder -Array.

Diese Anordnung eignet sich zur Oberflächenprüfung, allerdings versagt sie bei sehr rauen Oberflächen. Die Vertiefung, die zwei benachbarten Interferenzstreifen entspricht, ist $\frac{\lambda}{2}$. Zur Behebung der Mehrdeutigkeit werden

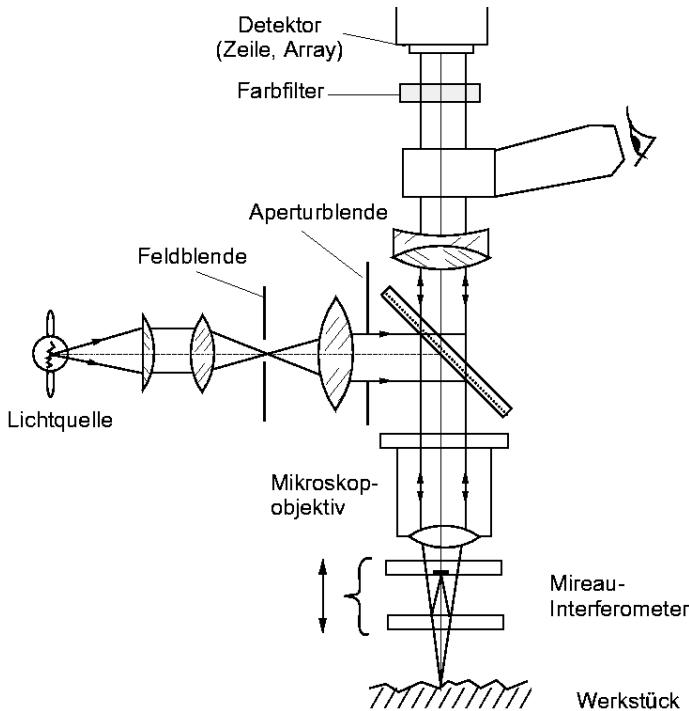


Abb. 13.12. Mireau-Interferometer zur Mikrostrukturanalyse

zur Zeit Zwei- und Dreiwellenlängenverfahren untersucht. Mit dem skizzierten Aufbau können auch Eindrücke zur Härteprüfung vermessen werden.

Das Phasenschiebeverfahren eignet sich aber auch zur Mikroprofilanalyse, wo Höhenauflösungen von $0,1\text{ nm}$ erreicht werden, bei wenigen μm Lateralauflösung. Allerdings sind polierte Oberflächen erforderlich. Wird ein Twyman-Green-Typ-Interferometer für mikroskopische Untersuchungen benutzt, müssen optische Komponenten wie Objektive im Referenz- und Prüfarm möglichst identisch sein. Die Phasenschiebung erfolgt im Referenzarm mittels Piezoelementen, dies ist auch in Abb. 13.12 angedeutet. Als Ergebnis einer Untersuchung zeigt Abb. 13.13 das Profil einer Compact Disc (CD) in Pseudo-3D-Darstellung, Breite der „pits“ $0,6\mu\text{m}$, Tiefe 120 nm , Spurabstand $1,6\mu\text{m}$.

Die Auswertung der Streifen bei der holographischen und der Speckle-Interferometrie erfolgt in analoger Weise.

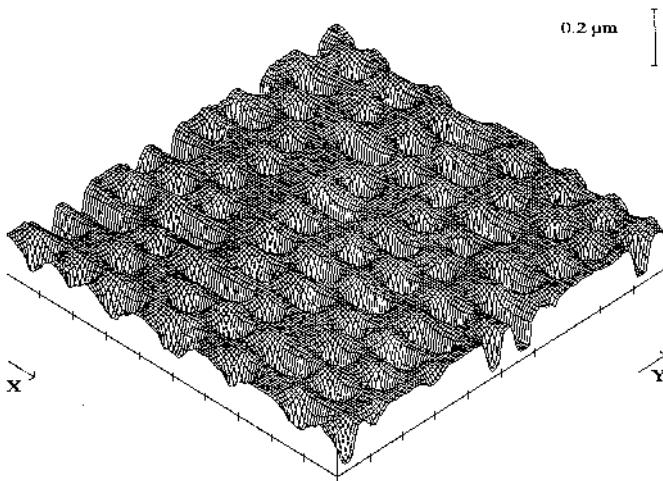


Abb. 13.13. Auswertung einer CD mit modifiziertem Interferenzmikroskop mit automatischer Streifenauswertung

13.4 Heterodynverfahren

In der klassischen Interferometrie werden Phasenvariationen in Intensitätsvariationen umgewandelt. Bei der Zweistrahlheterodyninterferometrie wird eine Frequenzvariation, die von der zeitlich variierenden optischen Wegänderung herrührt, analysiert, wobei die interferierenden Wellen $A_1 = a_1 \cos(\omega_1 t + \phi_1)$ und $A_2 = a_2 \cos(w_1 t + D\omega t + \phi_2 + \phi(t))$ zur Intensität

$$I = |A_1|^2 + |A_2|^2 + 2a_1 a_2 \cos(\Delta\omega t + \phi(t) + \phi_2 - \phi_1)$$

führen. Dabei ist $\Delta\omega = 2\pi(f_2 - f_1)$ proportional zur konstanten Frequenzänderung, die beispielsweise durch eine Bragg-Zelle, Zeemann-Aufteilung der Frequenzen oder polarisationsoptisch eingeführt werden kann. Der Heterodynempfänger detektiert die Intensität

$$I = 2a_1 a_2 \cos\{\Delta\omega t \pm \phi(t) + \phi_2 - \phi_1\}. \quad (13.8)$$

Daraus wird die zeitabhängige Phase $\phi(t)$ ermittelt. $\phi_2 - \phi_1$ sind gerätespezifische Phasen. Die Auswertung erfolgt nach bekannten Verfahren der Frequenzanalyse, wobei bei undurchsichtigen Objekten

$$\phi(t) = \frac{2\pi}{\lambda} 2v(t) t \quad (13.9)$$

in der Geschwindigkeitskomponente v in Strahlrichtung gilt. Die gemessene Frequenz f_{gem} setzt sich zusammen aus

$$f_{\text{gem}} = f_2 - f_1 \pm \frac{2v(t)}{\lambda}. \quad (13.10)$$

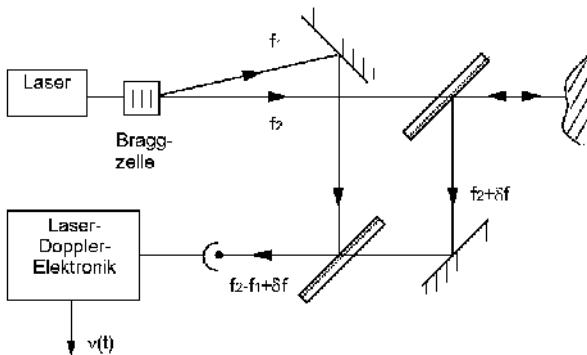


Abb. 13.14. Anordnung zur Schwingungsmessung mit Heterodynprinzip

Daraus errechnen sich $v(t)$ und die Wegänderung

$$z = \int v(t) dt \quad 14. \quad (13.11)$$

Bei harmonisch oszillierenden Objekten folgt aus $\phi(t) = \frac{4\pi}{\lambda} \rho \cos(\Omega t)$ die Schwingungsamplitude ρ und Frequenz Ω . Das beschriebene Prinzip ist die Grundlage für die hochgenaue Abstands-, Bewegungs-, Geschwindigkeits- und Schwingungsmessung [3, 5].

Die Frequenzverschiebung Δf ($\Delta f = f_2 - f_1$) ist gering im Vergleich zur Lichtfrequenz. Vielfach wird sie im Referenzstrahl eingeführt, z.B. durch eine Bragg-Zelle mit $\Delta f = 40$ MHz. Der Lichtempfänger registriert dann ein frequenzmoduliertes Signal mit einer Mittenfrequenz von 40 MHz. Dieses wird demoduliert, um die Frequenz und Amplitude der Schwingung zu bestimmen (Abb. 13.14).

13.5 Interferometrische Längenmessung

Erst seit der Einführung des Lasers ist die interferometrische Distanzmessung über größere Strecken realisierbar. Heute haben die Laser Kohärenzlängen von einigen 100 m und Frequenzstabilitäten, die besser als 10^{-8} sind.

Grundsätzlich erlauben die heutigen Laserlichtquellen Distanzmessungen über mehrere m mit Genauigkeiten von $\frac{\lambda}{10}$ des verwendeten Lichts. Allerdings begrenzen Umwelteinflüsse diese Genauigkeiten.

Die zur Längenmessung benutzte Interferometeranordnung ist durchweg vom Michelson-Typ, Twyman Green, entsprechend Abb. 13.15. Um gegen Verkippungen der Endspiegel unempfindlich zu sein, werden diese als Tripel-Spiegel ausgeführt.

Das in Abb. 13.5 dargestellte Interferometer kann nicht zwischen den zwei Richtungen der Spiegelbewegung unterscheiden, sondern nur vorwärts zählen.

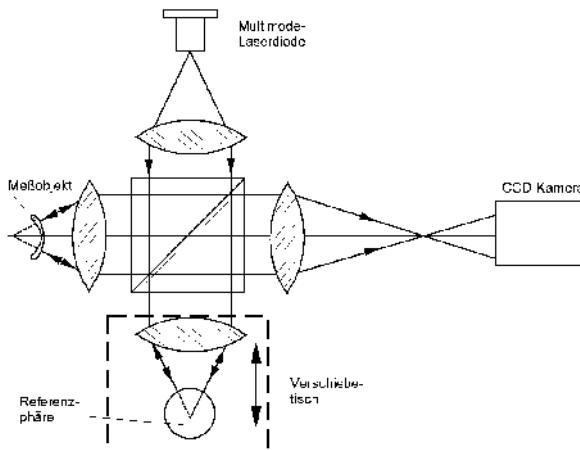


Abb. 13.15. Prinzipskizze eines kurzkohärenten Interferometers zur Messung von Linsenformen

Es gibt verschiedene Verfahren, die Richtung der Spiegelbewegung zu erfassen. Das sog. Quadraturverfahren arbeitet mit zwei zueinander um $\pi/2$ verschobenen Lichtbündeln. Dieses wird entweder durch eine geometrische Zweiteilung des Strahlengangs in einem Interferometerarm oder durch zwei orthogonal zueinander polarisierte Lichtbündel erreicht. Am weitesten entwickelt ist das beschriebene Heterodynverfahren, wo zwei Lichtbündel mit unterschiedlicher Frequenz eingesetzt werden. Die Frequenzverschiebung kann mit unterschiedlichen Verfahren, z.B. mit Hilfe der im letzten Abschnitt eingesetzten Bragg-Zelle, einem rotierenden Gitter, polarisationsoptisch oder einem Zweifrequenzlaser erfolgen. Bei einem (in Abb. 13.16 als Lichtquelle dienenden) HeNe-Zweifrequenzlaser befindet sich das Entladungsrohr in einem longitudinalen Magnetfeld. Infolge der Zeemann-Aufspaltung der Energieniveaus treten zwei Laserlinien auf, eine links und eine rechts zirkular polarisiert. Die Frequenzdifferenz $f_2 - f_1$ hängt linear von der Größe des Magnetfeldes ab. Eine am Laserausgang angeordnete $\lambda/4$ -Platte macht daraus zwei senkrecht zueinander linear polarisierte Teilstrahlen mit den Frequenzen f_1 und f_2 . Der in das Interferometer eintretende Messstrahl wird durch einen Polarisationsstrahlteiler S_2 auf die beiden Interferometerarme verteilt; Teilstrahl (1) durchläuft den Referenzarm, Teilstrahl (2) den Messarm. Beim Verschieben des Messspiegels erfährt der Messstrahl eine Dopplerverschiebung von $\delta f = \frac{2v_z}{\lambda}$ nach (13.10). Da beide Strahlen jeweils zweimal durch eine $\lambda/4$ -Platte gelaufen sind, haben sich ihre Polarisationsrichtungen um 90° gedreht; Strahl (1) passiert nun den Strahlteiler, wogegen Strahl (2) reflektiert wird. Das um 45° gegen die beiden Polarisationsrichtungen orientierte Polfilter ermöglicht nun die Interferenz der beiden orthogonal zueinander po-

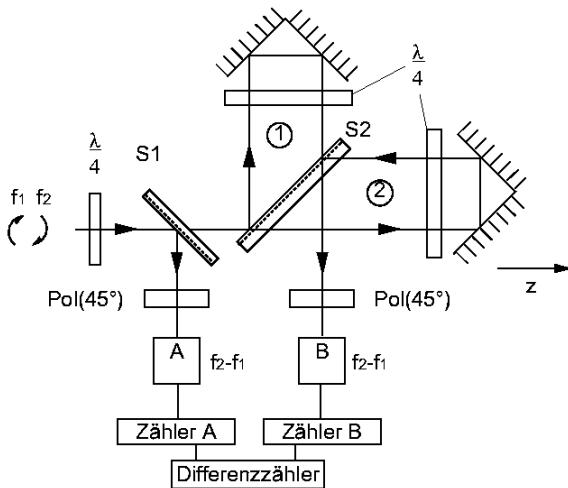


Abb. 13.16. Vorwärts-Rückwärts-Zählung mit zwei Frequenz-HeNe-Lasern

larierten Strahlen (1) und (2). Mit Detektor B wird die um

$$\delta f = -\frac{2v_z}{\lambda} = -\frac{2\delta z}{\lambda\delta t}$$

frequenzverschobene Beatfrequenz $f_B = f_2 - f_1 + df$, mit Detektor A die „Referenz“beatfrequenz $f_A = f_2 - f_1$ registriert. In einem Differenzzählern, er mit der Frequenz f_A aufwärts und mit der Frequenz f_B abwärts zählt, findet die zeitliche Integration der Differenzfrequenz $f_A - f_B$ statt; man erhält einen zum Verschiebeweg Δz proportionalen Zählerstand Z :

$$Z = (f_A - f_B) = - \int \delta f \, dt = \frac{2}{\lambda} \int \frac{\delta z}{\delta t} \, dt = \frac{2\Delta z}{\lambda}.$$

Dieses Verfahren misst nur die Änderungen des Messspiegelabstands z ; der absolute Wert bleibt unbekannt. Zur Messung können Strahlteiler und Referenzspiegel beispielsweise ortsfest am Maschinenbett aufgestellt werden, während der am Werkzeugschlitten befestigte Messspiegel die Messstrecke durchfährt.

13.5.1 Interferometrische Messung geometrischer Größen und Fehlerquellen

Die beschriebene Längenmessung ist Basis für weitere geometrische Messungen mit Laserinterferometern. Dazu gehören beispielhaft die Messungen von

- Geradheit – Abstandsgleichheit – Rundlauf,
- Ebenheit – Fluchtung – Oberflächen,
- Parallelität – Rechtwinkligkeit – Mikroprofilometrie.

Fast alle diese Messaufgaben sind prinzipiell Messungen der Abweichung von der Geradheit. Sie unterscheiden sich lediglich durch die jeweiligen Messbedingungen und die Darstellungsweise. So werden z.B. bei der Vermessung eines Maschinenteils die ermittelten Abweichungen auf zwei Referenzpunkte auf dem Prüfling bezogen, während bei der Überprüfung einer Bewegung die tatsächliche Bewegungssachse nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate aus den Messwerten ermittelt wird.

13.5.2 Fehlerquellen

Zu den allgemein bei jeder Präzisionsmessung auftretenden Fehlern kommen beim Einsatz von Laserinterferometern solche, die auf der Änderung der Wellenlänge und der Brechzahl basieren. Die Ursachen für die Veränderung in der Wellenlänge können im Laser selbst liegen, können aber auch durch die Veränderung der Brechzahl in der Messstrecke bedingt sein. Die Wellenlänge der emittierten Strahlung hängt hauptsächlich von der optischen Weglänge (Brechzahl \times geometrische Länge) des Resonators ab; diese kann durch Temperatur und Druckschwankungen kurzfristig und durch Alterungsvorgänge langfristig verändert werden. Deshalb ist besonders bei Halbleiterlasern eine Kühlung für genaue Messungen erforderlich.

Die Wellenlänge $\lambda = \frac{\lambda_0}{p}$ (λ_0 = Vakuumwellenlänge) im Interferometer ist stark abhängig von den Umweltbedingungen. Beispielsweise verändert sich die Wellenlänge um einen Bruchteil von $10^{-6} \lambda$, wenn sich die Temperatur der Luft im Messstrahl um 1° oder der Luftdruck um 0,1 Torr oder die Luftfeuchtigkeit um 30% verändern. Für genaue Messungen müssen Temperatur und Luftfeuchtigkeit so nahe wie möglich an der Messstrecke gemessen werden. Mit Hilfe empirischer Formeln lässt sich aus Druck, Temperatur und Luftfeuchtigkeit die Brechzahl sehr genau bestimmen und das Messergebnis rechnerisch korrigieren.

Beim industriellen Einsatz interferometrischer Verfahren sind Störanfälligkeitkeiten z.B. durch Schwingungen, Temperaturänderungen, allfällige Kühlmittel zu beachten. Schnelle, automatische Streifenauswertungsverfahren sind dabei sehr hilfreich.

13.6 Weitere Verfahren der interferometrischen Messtechnik

13.6.1 Zweiwellenlängen-(2λ)-Verfahren

Interferometrische Verfahren sind sehr empfindlich gegen Störungen durch z.B. eine rauhe Oberfläche. Interferometrie mit größerer Wellenlänge, z.B. $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$ (CO_2 -Laser), bringt hier eine Verbesserung. Allerdings fehlen heute noch geeignete Detektoren für flächenhafte Interferenzstreifensysteme. Eine Alternative ist das Interferenzverfahren mit zwei benachbarten Wellenlängen [2, 6].

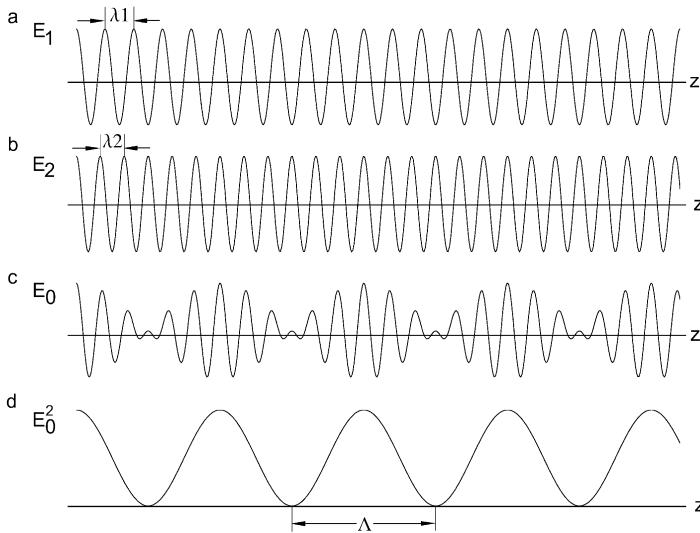


Abb. 13.17. Schwebungsfrequenzen bei der 2λ -Interferometrie

Durch die Überlagerung von zwei harmonischen Wellen unterschiedlicher Wellenlängen oder Frequenzen entstehen Schwebungsfrequenzen (Beatfrequenzen), die in Abb. 13.17 zu sehen sind. Die resultierende Wellenlänge ist

$$\Lambda = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{|\lambda_1 - \lambda_2|}.$$

Die resultierende längere Wellenlänge eignet sich insbesondere zur Absolutmessung, da die optischen Wegänderungen nur innerhalb der Wellenlänge eindeutig sind. Auch bei optisch rauen Oberflächen bieten sich Vorteile.

13.6.2 Interferometer mit computergeneriertem Prüfhologramm

Wird ein Hologramm mit einer Referenzwelle beleuchtet, entsteht durch Beugung an den Hologrammstrukturen die Rekonstruktion der Objektwelle. Umgekehrt kann auch das Hologramm mit der Objektwellenfront beleuchtet werden. Es wird die Referenzwelle rekonstruiert. Diese Eigenheit kann zur Optikprüfung, speziell zur Prüfung asphärischer Flächen, genutzt werden. Das Verfahren wurde prinzipiell schon im Buch von Malacara erläutert [8]. Durch die digitale Interferometrie sind die Einsatzmöglichkeiten erweitert und verfeinert worden [4].

13.6.3 Weißlichtinterferometrie

Weißlichtinterferometrie ist zwar nicht neu, hat aber in den letzten Jahren neuen Auftrieb erhalten. Anwendungen finden wir sowohl in der Oberflächen-

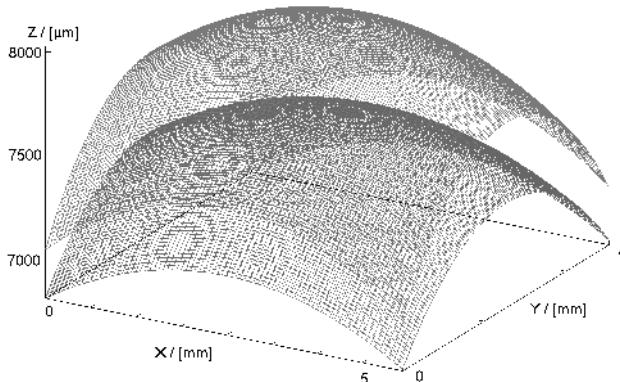


Abb. 13.18. Messung einer Kontaktlinse mittels kurzkohärenter Interferometer

messtechnik als auch in der Medizin zur Vermessung der Hautoberfläche, aber auch zur Tomographie im Hautgewebe.

Prinzipiell geht es um die Feststellung des maximalen Interferenzkontrastes. Der Bereich für das Auftreten von Interferenzstreifen wird durch die Kohärenzlänge der Lichtquelle auf wenige μm beschränkt. Ausgehend von Abb. 13.5 erhalten wir maximalen Streifenkontrast, wenn der optische Wegunterschied Null wird. Einen typischen Aufbau für die Vermessung von sphärischen Oberflächen finden wir in Abb. 13.15 als Zweistrahlinferenzanordnung zusammen mit dem Streifenkontrast. In Abb. 13.18 wird beispielhaft die Vermessung der Vor- und Rückseite einer Kontaktlinse gezeigt.

Literatur

1. Brunning JH (1978) Fringe scanning interferometers. In: Malacara E (ed.) Optical shop testing. Wiley, New York
2. Creath K (1986) Comparision of phase measurement algorithmus. Proc SPIE 680
3. Dändliker R (1980) Progress in Optics, vol. 17 (1) (Ed. Wolf E). North Holland, Amsterdam
4. Dörband B, Tiziani HJ (1985) Testing aspheric surfaces with computer generated holograms; analysis of adjustment and shape errors. Appl Optics 24:2604–2611
5. Greivenkamp SE (1984) Generalized data reduction for heterodyne interferometry. Opt Eng 23:350–352
6. Küchel FM, Tiziani HJ (1981) Real-time contour holography using BSO crystals. Opt Comm 38:17–21
7. Küchel FM, Schmieder T, Tiziani HJ (1983) Beitrag zur Verwendung von Zernike-Polynomen bei der automatischen Interferenzstreifenauswertung. Optik 65:123–142
8. Malacara E (1978) Optical shop testing. Wiley, New York

9. Schwider J, Burow R, Elssner KE, Grzonna J, Spolaczyk R, Merkel K (1983) Digital wave-front measuring interferometry; some systematic sources. *Appl Opt* 22:421–432
10. Steel WH (1983) Interferometry. Cambridge University Press
11. Takeda M, In H, Kobayashi S (1982) Fourier transform method for fringe pattern analysis for computerbased topography and interferometry. *JOSA* 72:156–160
12. Tiziani HJ (1987) Rechnerunterstützte Laser-Messtechnik. *Technisches Messen tm* 54:221–230

14 Lasersysteme

J. Bille

14.1 Gaslaser

Bei dieser Laserkategorie liegt das aktive Medium in gas- oder dampfförmiger Phase vor. Die meisten Gase, insbesondere Edelgase, eignen sich als Lasermedium. Jedes von ihnen liefert mehrere Laserübergänge. So sind z.B. von Ne über 180 Laserlinien bekannt. Die Emissionsbereiche erstrecken sich vom UV- bis in den Submillimeterwellenbereich. Die Gaslaser umfassen Neutralatom- (z.B. HeNe, Metalldampf), Ionen- (z.B. Ar^+), Molekül- (z.B. CO_2) und Excimerlaser (z.B. KrF). Gaslaser besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sie für Anwendungen in Industrie, Forschung und Medizin besonders geeignet machen. Die Anregung des aktiven Mediums in einem Gaslaser geschieht gewöhnlich durch eine elektrische Entladung.

14.1.1 Helium-Neon-(HeNe-)Laser

Energieniveauschema und Laserprinzip. Der HeNe-Laser ist der typische Vertreter der Neutralatomgaslaser. Er war der erste kontinuierliche Laser wie auch der erste Gaslaser der Geschichte. Heute ist der HeNe-Laser vor allem wegen der sichtbaren Emissionslinie bei 632,8 nm ein weit verbreiteter Laser [8].

Abbildung 14.1 zeigt die Energieniveaus von He und Ne, die für die Laserprozesse relevant sind. Lasertätigkeit geschieht zwischen Energieniveaus von Ne, während He nur zur Unterstützung des Pumpprozesses beigemischt wird. In einem Gasgemisch, welches typisch 1 mbar He und 0,1 mbar Ne enthält, wird eine dc- (oder rf-)Entladung geziündet. Die energiereichen Entladungselektronen regen die He-Atome in verschiedene angeregte Zustände an. In der Zerfallskaskade sammeln sich die He-Atome in den metastabilen Zuständen 2^3S und 2^1S mit Lebensdauern von 10^{-4} s und $5 \cdot 10^{-6}$ s. Da diese langlebigen 2^3S und 2^1S Zustände von He beinahe mit den $2s$ - und $3s$ -Zuständen von Ne koinzidieren, können Ne-Atome in diese angeregten Zustände durch Stöße zweiter Art angeregt werden. Die Energiedifferenz ΔE , z.B. $\Delta E = 400 \text{ cm}^{-1}$ im Fall des $2s$ -Niveaus, wird dabei in kinetische Energie der Atome nach dem Stoß umgewandelt. Diese resonante Energietransfer von He auf Ne ist der Hauptpumpmechanismus im HeNe-System, obwohl auch direkte Elektron-Ne-Stöße zum Pumpen beitragen.

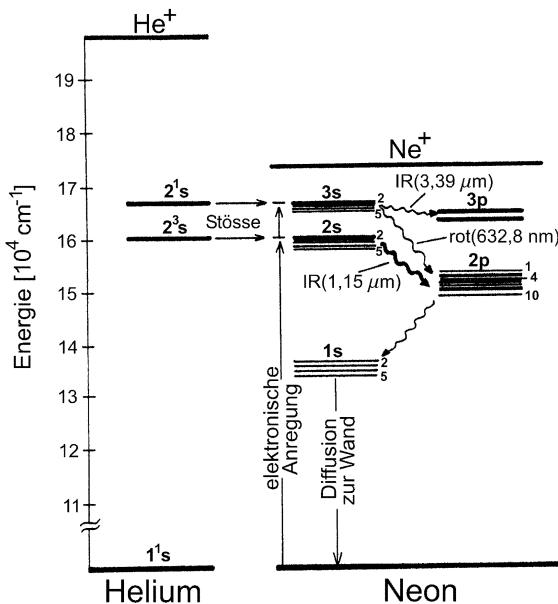


Abb. 14.1. HeNe-Energieniveauschema mit den dominanten Übergängen

Konstruktion. Das Entladungsrohr wird durch *Brewster-Fenster* abgeschlossen, sodass elektromagnetische Strahlung mit dem E -Vektor in der Zeichenebene keine Reflexionsverluste erfährt (Abb. 14.2). Die Laserstrahlung ist somit in der Zeichenebene linear polarisiert. Heute werden die beiden Enden des Entladungsrohrs meist direkt mit den Resonatorspiegeln in „Hard-seal“-Technik abgeschlossen. Dies ergibt erhöhte Betriebsdauern von typisch 20 000 h. Für den Betrieb müssen zusätzlich zu den optischen Daten der Resonatorspiegel der Gasdruck, das He:Ne-Mischungsverhältnis und die Entladungsstromdichte optimiert werden.

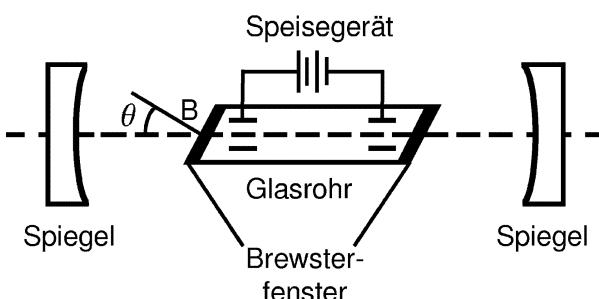


Abb. 14.2. Typischer Aufbau eines HeNe-Laser

Anwendungen. In der Medizin werden HeNe-Laser hauptsächlich als Justierlaser und in Diagnostiksystemen eingesetzt.

14.1.2 Argon-Ionen-(Ar^+ -)Laser

Energieniveauschema und Laserprinzip. Der Ar^+ -Laser wurde im Jahre 1964 erstmals realisiert. Er ist der typische Vertreter der Ionengaslasers. Der Unterschied zum Neutralgaslaser liegt in der Verwendung von *Ionen* statt neutralen Atomen als aktives Medium. Die Laserübergänge finden zwischen hochangeregten Zuständen des einfach ionisierten Argonatoms statt (vgl. Abb. 14.3a). Das obere Laserniveau des Ions wird durch zwei sukzessive Stöße mit Elektronen der Gasentladung bevölkert. Der erste Elektronenstoß produziert ein Ion aus dem Neutralatom, während der zweite Elektronenstoß das Ion weiter anregt. Damit dieser Zweistufenprozess einigermaßen effizient abläuft, ist eine gegenüber dem Neutralatomlaser wesentlich erhöhte Entladungsstromdichte notwendig. Dies stellt strengere Anforderungen an die Kühlung und Herstellung des abgeschlossenen Laserrohrs. Das obere Laser niveau ($4p$) kann durch drei verschiedene Arten besetzt werden:

- Elektronenstöße mit Ar-Ionen im Grundzustand (Prozess a);
- Elektronenstöße mit Ionen in metastabilen Zuständen (Prozess b);
- Strahlungszerfälle von höherem Niveau (Prozess c).

Wie aus Abb. 14.3 ersichtlich, ist das obere Laserniveau $4p$ rund 20 eV über dem Grundzustand von Ar^+ bzw. ca. 35,7 eV über dem Grundzustand von

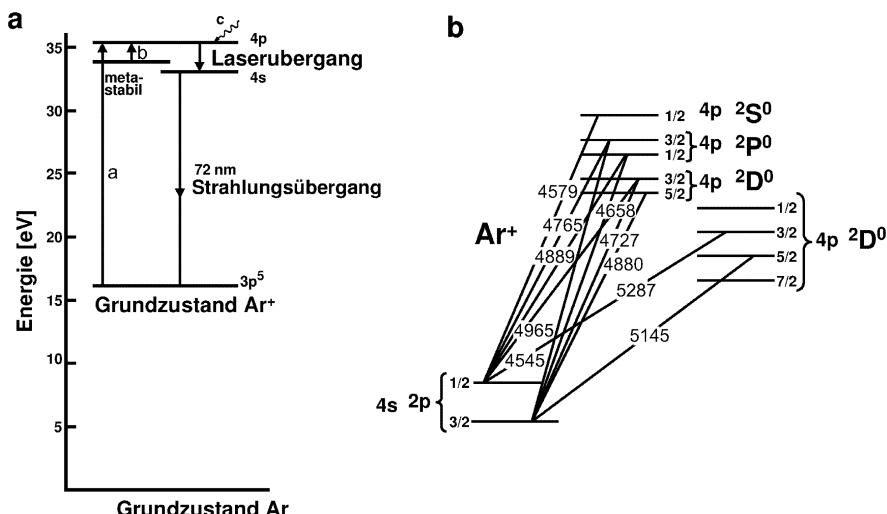


Abb. 14.3. Energieniveauschema (a) und Laserübergänge mit Wellenlängen in Å (b) von Ar^+

Ar. Damit können nur die energiereichen Elektronen in der Entladung zur Anregung beitragen. Das untere Laserniveau ist das $4s$ -Niveau von Ar^+ . Es hat eine Lebensdauer von 1 ns, da es mit dem Grundzustand von Ar^+ über einen Strahlungsübergang (72 nm) verbunden ist. Das $4p$ -Niveau hingegen weist eine wesentlich längere Lebensdauer von ca. 10 ns auf. Damit ist die Forderung für einen kontinuierlichen Laserbetrieb auch für diesen Lasertyp erfüllt. Da die $4p$ - und $4s$ -Niveaus des Ar^+ aufgespalten sind, gibt es mehrere Laserübergänge. Abbildung 14.3b zeigt einen detaillierten Ausschnitt aus den $4p$ - und $4s$ -Niveaus von Ar^+ mit zehn Laserübergängen. Die intensivsten Emissionslinien sind bei 488 nm (blau) und 514,5 nm (grün), wo Dauerstrichleistungen über 100 W bei Kleinsignalverstärkungen von rund 2%/cm erreicht wurden.

Konstruktion. An das Entladungsrohr eines Ionenlasers werden wegen der hohen Stromdichten von $30\text{--}150 \text{ A/cm}^{-2}$ und Plasmatemperaturen von rund 3000 K hohe Anforderungen gestellt. Das Rohrmaterial besteht meist aus Keramik, beispielsweise aus Berylliumoxid (BeO), das eine ähnlich große Wärmeleitfähigkeit wie Aluminium aufweist. Die Rohrwand ist in Kontakt mit dem Kühlwasser. Das Rohrinnere ist durch Lochscheiben aus Wolfram und Kupfer zur Abführung der Wärme in zahlreiche Segmente unterteilt.

Neben seiner hohen Ausgangsleistung hat der Ar^+ -Laser den Vorteil, dass er auf mehreren Wellenlängen oszilliert. Die Trennung der einzelnen Emissionslinien geschieht mit einem drehbaren Prisma, das in Kombination mit einem Endreflektor als selektiver Resonatorspiegel wirkt. Eine solche Anordnung ermöglicht einen Einzellinienbetrieb mit einer Linienbreite von 4–12 GHz. Bei dieser Betriebsart oszillieren immer noch 10–20 longitudinale Moden gleichzeitig. Um Monomodenbetrieb zu erhalten, wird zusätzlich ein Fabry-Perot-Etalon in den Resonator eingefügt.

Anwendungen. Ar^+ -Laser werden in der Laserchirurgie speziell in der Dermatologie und der Ophthalmologie eingesetzt.

14.1.3 Kohlendioxid-(CO₂-)Laser

Einer der wichtigsten Laser für die industrielle und medizinische Anwendung ist der CO₂-Laser. Dieser Lasertyp zählt heute zu den leistungsstärksten Lasern. Es wurden Leistungen bis zu 100 kW in kontinuierlichem Betrieb erreicht. Außerdem zeichnet sich der CO₂-Laser durch einen hohen Wirkungsgrad von 15–20% aus.

Energieniveauschema und Laserprinzip. Das CO₂-Molekül ist ein lineares, symmetrisches Molekül mit einer Symmetrieebene in der Molekülachse und einer Symmetrieebene senkrecht zu dieser Achse. Somit kann das CO₂-Molekül drei Normalschwingungen ausführen.

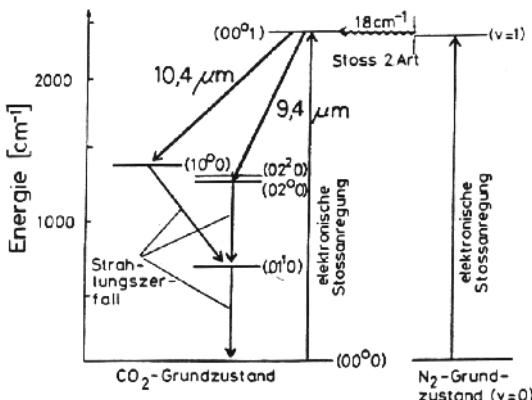


Abb. 14.4. Einige tieffliegende Vibrationsniveaus des CO₂- und N₂-Moleküls

Das obere Laserniveau (00°1) entspricht der Energie der asymmetrischen Stretschwung, welche mit einem einzigen Quant ($n_3 = 1$) der Energie $h\nu_3$ angeregt ist. Die Anregung dieses Niveaus geschieht normalerweise in einer Gasentladung, die neben CO₂ auch N₂ und He enthält. Es gibt aber auch andere Anregungsarten wie beispielsweise beim gasdynamischen CO₂-Laser. Die angeregten CO₂-Moleküle sammeln sich im langlebigen 00°1-Niveau, dessen Lebensdauer je nach Gasdruck, -temperatur und -zusammensetzung im Bereich von einigen μ s bis zu 1 ms liegt. Wie aus Abb. 14.4 hervorgeht, erfolgt die Anregung der CO₂-Moleküle nicht nur durch inelastische Stöße mit niedrigerenergetischen Elektronen in der Entladung, sondern auch durch Stöße 2. Art mit schwingungsangeregten N₂-Molekülen.

Aufgrund des Energieniveauschemas lässt sich für den CO₂-Laser ein Quantenwirkungsgrad von ca. 45% ableiten. In der Praxis werden dank den günstigen Anregungsbedingungen totale Wirkungsgrade (optische/elektrische Energie) von bis zu 30% erreicht, was im Vergleich zu anderen Lasertypen einen erstaunlich hohen Wert darstellt.

Das Emissionsspektrum des CO₂-Lasers besteht aus vielen Linien. Dies ist auf die Aufspaltung der beteiligten Vibrationsniveaus in Rotationszustände zurückzuführen, wie in Abb. 14.5 dargestellt. Die Rotationsniveaus werden durch die Quantenzahl J charakterisiert, und die entsprechenden Rotationsenergien sind näherungsweise gegeben durch

$$E(J) = hcBJ(J + 1). \quad (14.1)$$

Da das CO₂-Molekül linear ist, ein Symmetriezentrum besitzt und die Spins der ¹⁶O-Atome Null sind, treten im Rotationsspektrum bei den symmetrischen Vibrationsniveaus, z.B. (10°0), nur gerade J auf bzw. nur ungerade J bei den asymmetrischen Vibrationszuständen, z.B. (00°1). Es gilt aber zu beachten, dass bei Ersatz von einem der Sauerstoffatome durch ein anderes Isotop alle J -Zustände im Rotationsspektrum vorkommen.

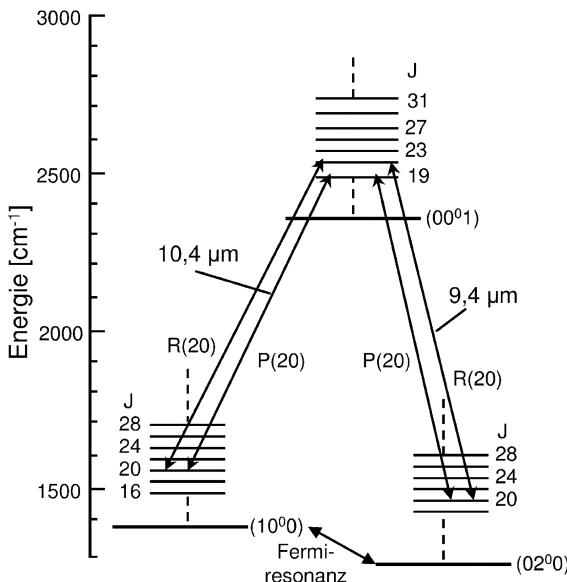


Abb. 14.5. Aufspaltung der beim CO₂-Laser beteiligten Vibrationsniveaus in Rotationsniveaus mit Beispielen von Laserübergängen

Für die Laserübergänge zwischen den verschiedenen Vibrations-Rotations-Niveaus gilt für elektrische Dipolübergänge die folgende Auswahlregel für die Quantenzahl J : $\Delta J = \pm 1$, $\Delta J = 0$ ist verboten.

In der Spektroskopie ist es üblich, den Rotationsübergang durch die Quantenzahl J des unteren Niveaus zu kennzeichnen, und jede Änderung von J bezieht sich auf dieses Niveau. Die Übergänge mit $\Delta J = -1$ werden zum P-Zweig, diejenigen mit $\Delta J = +1$ zum R-Zweig zusammengefasst. Der Q-Zweig ($\Delta J = 0$) existiert nicht. Die einzelnen Laserübergänge werden meist durch den Wellenlängenbereich des involvierten Vibrationsübergangs (10,4- μm - bzw. 9,4- μm -Band), den Zweig (P bzw. R) und die Quantenzahl J bezeichnet. Als Beispiel entspricht die in Abb. 14.5 eingezeichnete 10P(20)-Linie dem Übergang zwischen dem Rotationsniveau mit $J = 19$ des (00¹1)-Vibrationsniveaus und dem $J = 20$ -Zustand des (10⁰0)-Niveaus. Der Abstand der Laserlinien innerhalb des P-Zweigs beträgt ca. 2 cm⁻¹, innerhalb des R-Zweigs weniger als 1,5 cm⁻¹.

Das Emissionsspektrum eines CO₂-Lasers ist in Abb. 14.6 dargestellt. Deutlich sind die P- und R-Zweige des 9,4- μm - bzw. des 10,4- μm -Bandes sowie das Fehlen der entsprechenden Q-Zweige zu sehen.

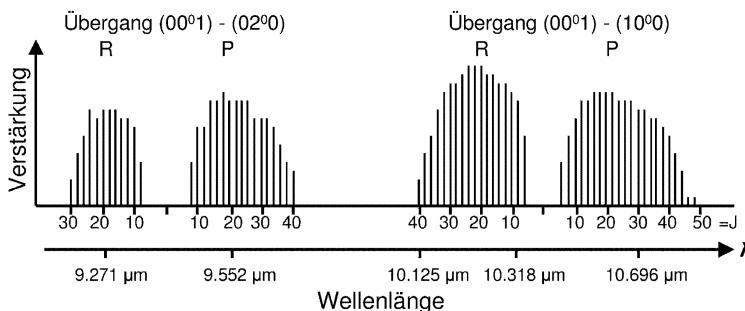


Abb. 14.6. Emissionsspektrum eines CO₂-Lasers als Funktion der Wellenlänge

Laserkonstruktion. Es gibt mehrere Betriebsarten für CO₂-Laser, die in die Typen unterteilt werden können, die in Tabelle 14.1 gelistet sind.

Tabelle 14.1. Eigenschaften von CO₂-Lasern

Typ (Anwendung)	Leistung (cw)	Pulsenergie Pulsleistung	Pulsdauer/ -frequenz
abgeschlossener Laser	50 W/m		
Wellenleiterlaser (Mo, S)	50 W		
langsame axiale Strömung	kW		
- gepulst (Ma, Me)		1 J/l; kW/m	> μs/100 Hz
- Q-switch (Ma)			100 ns/1 kHz
schnelle Gasströmung (Ma)	100 kW		
TEA-Laser (Ma)		10 J/l; GW	100 ns/kHz
gasdynamischer Laser (Ma, F)	100 kW	10 J	
Hochdrucklaser (S, U)	s. TEA- und Wellenleiterlaser		

CO₂-Laser mit langsamer axialer Gasströmung. Der typische Aufbau besteht aus einem wassergekühlten Glasrohr mit 1–3 cm Durchmesser. In dem CO₂-He-N₂-Gemisch wird eine Gleichstromentladung in axialer Richtung erzeugt. Die Gasströmung dient zur Entfernung von Dissoziationsprodukten wie CO und O₂ aus dem aktiven Volumen. Die Laserleistung (Tabelle 14.2) kann mit dem Entladungsstrom reguliert werden. Mit Lasern dieses Typs lassen sich Leistungen von 50–80 W pro Meter Entladungslänge erzielen. Der Wirkungsgrad liegt über 10%. Kommerzielle CO₂-Laser dieses Typs sind mit einer speziell gemischten Gasflasche mit etwa 101 und 140 bar ausgerüstet, die für etwa 50 Betriebsstunden ausreicht.

Tabelle 14.2. Strahleigenschaften kommerzieller CO₂-Laser

Typ	Strahldurchmesser	Divergenz
axiale Strömung	5–70 mm	1–3 mrad
abgeschlossener Laser	3–4 mm	1–2 mrad
Wellenleiterlaser	1–2 mm	8–10 mrad
TEA-Laser	5–100 mm	0,5–10 mrad

Abgeschlossener CO₂-Laser (Sealed-off Laser). Der Nachteil einer Gasflasche wird im abgeschlossenen Laser vermieden. Bei dieser Bauform werden die Dissoziationsprodukte CO und O₂ durch Zugabe von geringen Mengen von H₂O, H₂ oder O₂ chemisch umgewandelt. Weiterhin spielt das Elektrodenmaterial als Katalysator eine wichtige Rolle. Es können Dauerleistungen bis etwa 60 W/m mit mehreren 1000 Betriebsstunden erreicht werden. Insbesondere bei kleineren Leistungen und als Wellenleiterlaser hat dieser Laser-typ Vorteile.

Wellenleiterlaser (Waveguide Laser). Für Anwendungen mit Leistungen von 1–10 W werden luftgekühlte Wellenleiter-CO₂-Laser benutzt. Diese bestehen aus BeO- oder Al₂O₃-Kapillaren mit 1 mm Durchmesser, die als dielektrische Wellenleiter wirken. Die Strahlung wird an der Wandfläche reflektiert, wobei sich ähnlich wie bei Hohlleitern für Mikrowellen stehende Wellenformen ausbilden. Dadurch verringern sich die Beugungsverluste.

Anwendungen. In der Medizin sind die CO₂-Laser sowohl in der allgemeinen Chirurgie als auch in Spezialdisziplinen wie Gynäkologie, Neurochirurgie und neuerdings der Herzchirurgie (*heart laser*) eingesetzt.

14.1.4 Excimerlaser

Als *Excimere* bezeichnet man Moleküle, die nur in elektronisch angeregten Zuständen existieren können. Die Bezeichnung *Excimer* stammt von *excited dimer* und bedeutet angeregtes Dimer, wobei ein Dimer ein aus zwei identischen Atomen bestehendes Molekül ist. Da Excimere nur in elektronisch angeregten Zuständen existieren, ist der elektronische Grundzustand unbesetzt. Im Kontrast zur Bedeutung ihrer Benennung verwenden die üblicherweise als Excimer bezeichnete Lasersysteme Edelgas-Halogen-Moleküle.

Energieniveauschema und Laserprinzip. Die Potentiale der für die Laseremission wichtigen elektronischen Energiezustände der zweiatomigen Edelgashalogenexcimere sind in Abb. 14.7 dargestellt. $^2\Sigma$ und $^2\Pi$ bezeichnen die Art der Elektronenbindung zwischen den beiden Atomen. Die Symbole stehen für ^{2S+1}L , wobei S den Spin- und L den Bahndrehimpuls entlang der

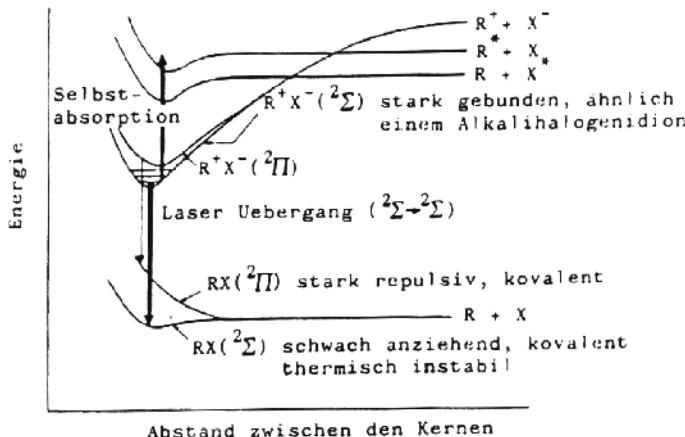


Abb. 14.7. Energiepotentiale der Edelgashalogenide

Verbindungslinie darstellt. Für L benutzt man große griechische Buchstaben Σ , Π , Δ , Φ , etc. analog zu den $s, p, d \dots$ -Bezeichnungen bei den Elektronenorbitalen im Atom.

Aus Abb. 14.7 sind die stark gebundenen Potentiale der angeregten Zustände wie auch die praktisch flachen oder repulsiven Potentialkurven des Grundzustands ersichtlich. In einem angeregten Zustand bilden sich Edelgashalogenide, da ein angeregtes Edelgasatom chemisch einem Alkaliatom ähnlich wird. Gebildet werden die zweiatomigen Excimere hauptsächlich durch die beiden Reaktionskanäle



wobei R und X das Edelgas bzw. das Halogenatom bedeuten und M ein Stoßpartner ist, der aus Gründen der Energie- und Impulserhaltung an der Bildung des Excimers in der ersten Reaktion (14.2) beteiligt sein muss. Die Ionisation oder die elektronische Anregung wird meist in einer gepulsten Hochspannungsentladung erzeugt. Wie aus Abb. 14.7 ersichtlich, ist der erste elektronisch angeregte Zustand für kleine internukleare Abstände in zwei Zustände ${}^2\Sigma$ und ${}^2\Pi$ aufgespalten. Die Potentialkurve des ${}^2\Sigma$ -Grundzustands ist praktisch flach oder höchstens leicht gebunden. Im Fall von $XeCl^*$ beträgt die Potentialtiefe beispielsweise 255 cm^{-1} , was ungefähr kT bei Raumtemperatur entspricht, sodass diese Moleküle thermisch instabil sind. Der ${}^2\Pi$ -Grundzustand ist immer stark repulsiv.

Falls nun in einem gegebenen Volumen durch irgendeine Maßnahme Excimere gebildet werden, so ist dies gleichbedeutend mit einer Besetzungsinversion, da ja die Moleküle im Grundzustand praktisch nicht existieren, sondern nach einer mittleren Lebensdauer von 10^{-12} s dissoziieren. Die Lebensdauern

τ der oberen Laserniveaus gegenüber Strahlungszerfall betragen demgegenüber rund 10 ns, so z.B. $\tau = 7$ ns für KrF* bzw. $\tau = 16$ ns für XeF*, sodass Besetzungsinversionen relativ leicht herzustellen sind. Der Laserübergang erfolgt vom ersten angeregten, gebundenen elektronischen Zustand zum elektronischen Grundzustand.

Verschiedene Photoabsorptionsprozesse beeinflussen im Edelgashalogenidexcimerlaser die Laseraktivität. Dazu gehören beispielsweise die Photodissociation der Halogenmoleküle X₂, aus denen gemäß Reaktion (14.3) das Edelgashalogenid RX* gebildet wird, oder die Photoionisation von angeregten Edelgasatomen und -molekülen, aber auch die Möglichkeit der Selbstabsorption der angeregten Edelgashalogenidexcimere RX*.

14.1.5 Konstruktion

Wegen der relativ kleinen Verstärkung müssen Excimerlaser stark gepumpt werden, um Laseraktion zu erzielen. Die Anregung erfolgt entweder durch einen intensiven Elektronenstrahl, durch eine elektrische Hochspannungsentladung oder durch eine Kombination von beiden. Sie findet in einem Gasgemisch statt, welches typischerweise aus 5–10% des aktiven Edelgases (z.B. Kr), 0,1–0,5% eines Halogens wie F₂ und einem leichten Puffergas wie He oder Ne bei einem Gesamtdruck von 1,5–4 bar besteht.

Abbildung 14.8 zeigt den Aufbau eines Excimerlasers, der mit einem intensiven, gepulsten Elektronenstrahl gepumpt wird, wobei die Elektronen relativistische Geschwindigkeiten aufweisen.

Die Elektronenstromdichte beträgt typisch 5–500 A/cm² mit Stromstärken von 5–50 kA. Die Pulsdauer ist 50 ns bis 1 μ s und die Beschleunigungsspannung 0,2–2 MV. Der Elektronenstrahl tritt durch eine 25–30 μ m dicke Metallfolie in das Gasmedium ein, wo typisch 5–50% der Elektronenstrahlenergie im Gas deponiert werden.

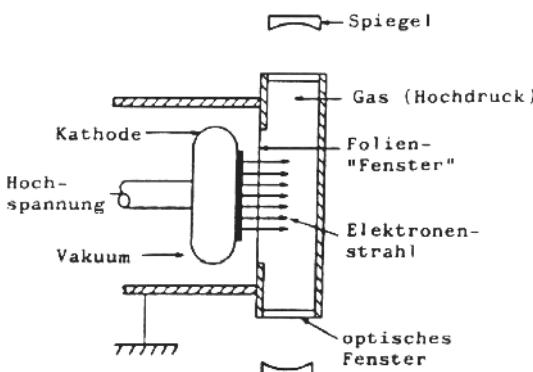


Abb. 14.8. Schema eines elektronenstrahlgepumpten Excimerlasers

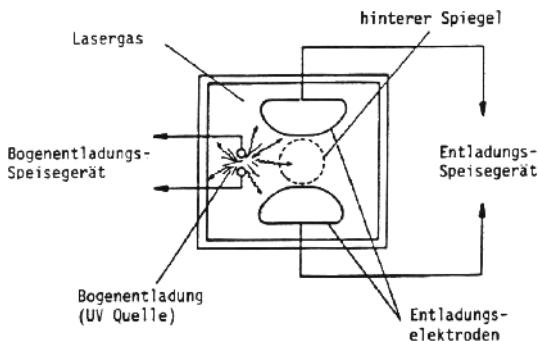


Abb. 14.9. Schema eines Excimerlasers, der mit einer elektrischen Entladung gepumpt wird

Erfolgt die Anregung mittels einer Hochspannungsentladung, so ist der Laseraufbau ähnlich wie derjenige eines TEA- CO_2 -Lasers mit UV-Vorionisierung, wie in Abb. 14.9 gezeigt wird.

Die Leistungsdichten der Hochspannungsentladungen müssen im Bereich von 200 MW pro Liter Gasvolumen liegen, um Verstärkungen von der Größenordnung $10\% \text{ cm}^{-1}$ zu erzielen. Solche Leistungen lassen sich nicht über längere Zeit in einem typischen Volumen von 1 l aufrechterhalten. Bei den verwendeten hohen Gasdrücken geht die Glimmentladung nach wenigen 10 ns aufgrund von Instabilitäten in eine Bogenentladung über. Alle Excimerlaser sind daher gepulste Laser mit 10–30 ns Pulsdauer. Es lassen sich sehr hohe Verstärkungen erzielen. Es können Energiedichten von ca. $40 \text{ J}/\varphi$ erwartet werden, ein Wert, der vergleichbar ist mit den Energiedichten eines IR-Hochleistungslasers wie z.B. des CO_2 -Lasers. Bei beiden Anregungstypen des Excimerlasers wird ein totaler Wirkungsgrad von ca. 1% erreicht. Da die Entladungstypen einen einfacheren und kompakteren Aufbau aufweisen, stehen sie im Vordergrund des Interesses und werden auch kommerziell angeboten.

Laserdaten. Aufgrund der geringen Anzahl optischer Umläufe, die während der kurzen Laseremission im Resonator möglich sind, gibt es kaum einen Wettbewerb unter den zahlreichen optischen Moden, sodass schließlich 10^5 – 10^7 Moden anschwingen. Die Strahlung von Excimerlasern weist daher normalerweise eine geringe zeitliche und räumliche Kohärenz auf.

Excimerlaser stellen heute die weitaus intensivsten UV Strahlungsquellen dar. In Laborsystemen wurden Pulsennergien im kJ-Bereich und Pulsspitzenleistungen im Bereich von $> 10^7 \text{ W}$ erreicht. Dank der kurzen Wellenlänge lässt sich die Laserstrahlung auf einen extrem kleinen Brennfleck fokussieren, sodass Intensitäten von $> 10^{15} \text{ W}/\text{cm}^{-2}$ möglich sind. In Tabelle 14.3 sind einige typische Daten von kommerziellen Excimerlasern zusammengestellt.

Tabelle 14.3. Typische technische Daten von kommerziellen Excimerlasern

Lasermedium		ArF	KrF	XeCl	XeF
Parameter					
Wellenlänge	[nm]	193	249	308	351
Pulsenergie bei 1 Hz	[nJ]	500	1000	500	400
Pulsdauer (physikalisch möglich < 200 fs)	[ns]	14	15	13	14
Spitzenleistung bei 1 Hz	[MW]	10	15	9	6
Repetitionsfrequenz	[Hz]	< 80	< 100	< 150	< 100
Durchschnittsleistung	[W]	10	20	10	6

Anwendung. In den letzten Jahren hat der ArF-Laser als Ablationslaser in der refraktiven Hornhautchirurgie besondere Bedeutung gewonnen.

14.1.6 Farbstofflaser

Mit weit über 100 Farbstoffen in wässrigen oder organischen Lösungen (Konzentration im Bereich 10^{-3} Mol/l) kann abstimmbare Lasertätigkeit von etwa 300 nm bis über 1 μm erreicht werden. Das Pumpen erfolgt in der Regel optisch, wobei gepulster und kontinuierlicher Betrieb erreicht wird. Der Farbstofflaser ist bei weitem der gebräuchlichste abstimmbare Laser mit zahlreichen Anwendungen in der Spektroskopie, Medizin, Biologie, Umweltschutz, Analysetechnik und Isotopentrennung. Aufgrund der hohen Bandbreite eignet sich dieser Lasertyp zur Erzeugung ultrakurzer Pulse bis in den Femtosekundenbereich, die zur Untersuchung schneller Prozesse, z.B. der Photosynthese dienen. In der Medizin wird der Farbstofflaser in der Augenheilkunde zur Behandlung der Netzhaut routinemäßig eingesetzt.

Energieniveauschema. Die für das Verständnis der Laseremission wichtigen Energieniveaus eines typischen organischen Farbstoffmoleküls sind in Abb. 14.10 schematisch wiedergegeben.

Die Energieniveaus S_i ($i = 1, 2, \dots$) bezeichnen elektronische Singulettzustände und T_i elektronische Tripletzustände. Stabile Farbstoffmoleküle besitzen oft eine gerade Anzahl Elektronen. In einem Singulettzustand ist der Spin des angeregten Elektrons antiparallel zum Totalspin der übrigen Elektronen, d.h. der Gesamtspin S der Elektronen ist Null. Für einen Tripletzustand ist der Spin des angeregten Elektrons parallel zum übrigen Gesamtspin, und es gilt somit $S = 1$. Die elektronischen Zustände sind aufgespalten in Vibrationsniveau und diese wiederum in Rotationsniveaus. Die Energiedifferenzen ΔE betragen typischerweise

1. zwischen elektronischen Niveaus $\Delta E(S_2 - S_1) \simeq \Delta E(S_1 - S_0) \simeq \Delta E(T_2 - T_1) = 20\,000 \text{ cm}^{-1}$;

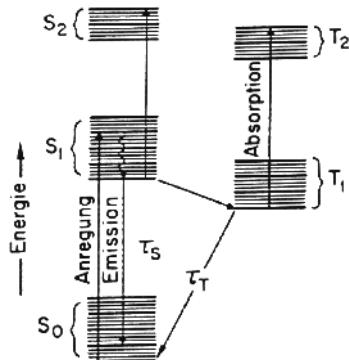


Abb. 14.10. Energieniveau eines organischen Farbstoffmoleküls

2. zwischen benachbartem Vibrationsniveaus innerhalb eines elektronischen Zustands $\Delta E \simeq 1500 \text{ cm}^{-1}$;
3. zwischen benachbarten Rotationsniveaus innerhalb desselben Vibrationszustands $\Delta E \simeq 15 \text{ cm}^{-1}$.

In einer Farbstofflösung sind die dicht liegenden Rotations-Schwingungs-Niveaus infolge der Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit Lösungsmittelmolekülen so stark stoßverbreitert, dass sie sich überlappen. Dies hat Absorptions- bzw. Emissionsbanden zur Folge.

Das Termschema eines Farbstofflasers, wie es in Abb. 14.10 dargestellt ist, entspricht einem Vierniveaulaser. Die prinzipiellen Eigenschaften eines vielatomigen Farbstoffmoleküls bezüglich Laseraktivität können auch am einfachen Termschema eines zweiatomigen Moleküls, wie es in Abb. 14.11 gezeigt wird, diskutiert werden.

In Abb. 14.11 sind die Potentiale des elektronischen Grundzustands S_0 und des ersten angeregten Zustands S_1 in Abhängigkeit des Kernabstands r dargestellt. Zusätzlich sind in beiden elektronischen Zuständen einige Vibrationsniveaus v mit den zugehörigen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $W_i(r)$ für die beiden Kerne eingezeichnet. So ist z.B. der wahrscheinlichste Kernabstand r für das Vibrationsniveau $v = 0$ des S_0 -Zustands $r = r_0$, während er für das ($v = 0$)-Niveau des S_1 -Zustands bei $r = r_1 > r_0$ liegt. Da bei Raumtemperatur die Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Vibrationsniveaus wesentlich größer ist als die thermische Energie kT , ist praktisch nur das Niveau $v = 0$ im S_0 -Zustand besetzt. Durch Absorption eines Pumpphotons gelangt das Molekül vom $S_0(v = 0)$ -Zustand in ein höheres Vibrations-Rotations-Niveau ($v > 0$) des S_1 -Zustands. Welches Niveau v dabei bevorzugt angeregt wird, bestimmt das Franck-Condon-Prinzip, welches sowohl für den Absorptions- wie auch für den Emissionsprozess zwei Aussagen macht:

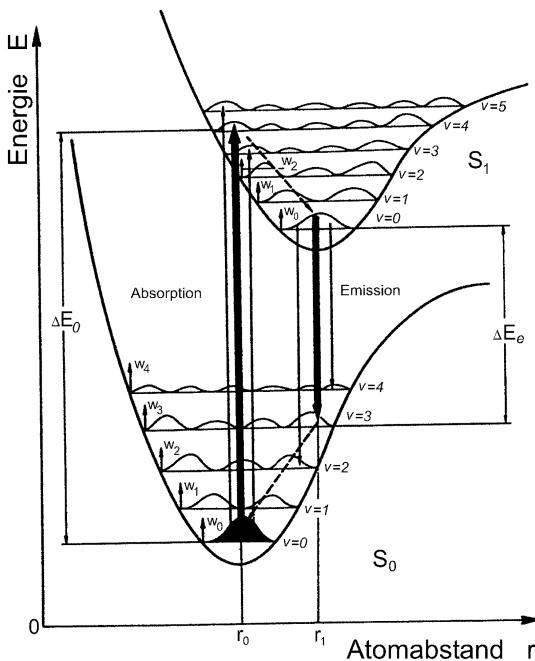


Abb. 14.11. Ausschnitt aus dem Termschema eines zweiatomigen Moleküls

1. der Kernabstand r ändert sich während des schnellen Absorptionsvorgangs nicht, d.h. der in Abb. 14.11 eingezeichnete Übergang erfolgt senkrecht nach oben;
2. der Übergang geschieht bevorzugt von einem Maximum der Aufenthaltswahrscheinlichkeit im S_0 -Zustand zu einem Maximum im S_1 -Zustand.

Für das Beispiel in Abb. 14.11 folgt daraus, dass das Molekül vorwiegend in das $S_1(v = 4)$ -Niveau, mit geringerer Wahrscheinlichkeit in die $S_1(v = 3)$ -bzw. $S_1(v = 5)$ -Niveaus gelangt. Die optische Absorption ist daher breitbandig mit einem Maximum bei der Photonenergie $h\nu = \Delta E_a$. Vom Zustand $S_1(v > 0)$ gelangt das Farbstoffmolekül durch inelastische Stöße mit Lösungsmittelmolekülen innert in einer sehr kurzen Zeit von 1–10 ps strahlungslos in das unterste Vibrationsniveau $v = 0$ des elektronisch angeregten Zustands S_1 . Dieser strahlungslose Übergang führt zu einer Erwärmung der Farbstofflösung. Vom Niveau $S_1(v = 0)$ kehrt das Molekül mit großer Wahrscheinlichkeit innert einer üblichen Zeit für erlaubte optische Übergänge von $\tau_s = 1\text{--}10\text{ ns}$ spontan unter Aussendung eines Photons in ein angeregtes Vibrations-Rotations-Niveau ($v > 0$) des elektronischen Grundzustands zurück. Gemäß dem Franck-Condon-Prinzip erfolgt der Übergang senkrecht nach unten zu einem Zustand maximaler Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Für das in Abb. 14.11 dargestellte Beispiel ist dies das $S_0(v = 3)$ -Niveau. Mit

geringerer Wahrscheinlichkeit erfolgen die Übergänge in das $S_0(v = 4)$ - bzw. $S_0(v = 2)$ -Niveau. Analog zur Absorption ist folglich auch die Emission breitbandig mit einem Maximum bei der Photonenergie $h\nu = \Delta E_e$.

Bei genügend hoher Pumpintensität kann zwischen dem Niveau $S_1(v = 0)$ und den höheren Vibrations-Rotations-Niveaus $S_0(v = l)$ mit $l > 1$ eine Besetzungsinvolution aufgebaut werden. Die Niveaus $S_0(v = l)$ weisen bei Raumtemperatur wegen des kleinen Boltzmann-Faktors $\exp(-E(v = l)/kT)$ eine vernachlässigbare Besetzung auf. Sobald die Verstärkung auf einem Übergang $S_1(v = 0) \rightarrow S_0(v = l)$ die Verluste überwiegt, startet die Laseroszillation. Dadurch wird das untere Laserniveau $S_0(v = l)$ besetzt, welches aber innerhalb einiger ps durch Stöße mit den Lösungsmittelmolekülen in den $S_0(v = 0)$ -Zustand entleert wird. Da auch dieser Prozess strahlungslos ist, fällt die gesamte Überschussenergie $\Delta E_a - \Delta E_e$ als Wärme an.

14.1.7 Laseraufbau

Anregung durch Blitzlampen. Farbstofflaser werden optisch gepumpt; die Verwendung von Blitzlampen führt zu relativ ökonomischen Konstruktionen. Dabei werden spezielle koaxial um eine zylindrische Laserküvette angeordnete Lampen mit kurzen Anstiegszeiten (100 ns) und Impulsdauern verwendet, von denen Laserpulse von 0,1–3 μ s Dauer erzeugt werden. Diese Blitzlampen bestehen aus einem Doppelzylinder; in dem inneren Zylinder befindet sich die Farbstofflösung und in der Wandung der Entladungskanal. Die Pumpenergien betragen 50–500 J. Daneben werden auch lineare Xe-Blitzlampen, ähnlich wie bei den Festkörperlasern, eingesetzt. Wegen der Besetzung des Triplettzustands sind kurze Pumppulse notwendig.

Die Ausgangsleistung handelsüblicher Farbstofflaser mit Blitzlampen kann bis zu 10^8 W betragen, die Pulsenergie einige Joule (Tabelle 14.4). Die Pulsfolgefrequenzen liegen im Bereich von 1–100 Hz. Es ist notwendig, die optisch

Tabelle 14.4. Eigenschaften von Farbstofflasern mit verschiedenen Pumpquellen. Die zitierten Abstimmbereiche werden bei der Verwendung mehrerer Farbstoffe erreicht

Pumpe	mittlere Leistung	Spitzenleistung	Pulsdauer	Linienbreite
Blitzlampe	100 W	10^5 W	1–10 μ s	Multim.: 10^{-1} – 10^{-2} nm Monom.: 10^{-4} nm
Nd:YAG (532; 355 nm)	1 W	10^6 W	10 ns	100 MHz
N_2 -Laser	1 W	10^5 W	1–10 ns	Fourier-begrenzt
Eximerlaser	10 W	10^7 W	1–10 ns	
cw-Ar ⁺ -Laser	20 W		kont.	< 1 MHz

gepumpte Farbstofflösungen mechanisch umzuwälzen, um störende Aufheizeffekte zu vermeiden. Der Wirkungsgrad für die Umwandlung von elektrischer, zum Betrieb der Blitzlampe notwendiger, Energie in Laserstrahlung liegt bei 0,5%.

Anregung durch Laser. Farbstofflaser für spektroskopische Anwendungen werden meist mit anderen gepulsten oder kontinuierlichen Lasern gepumpt. Die Pumpwellenlänge kann optimal zur Anregung des Farbstoffs gewählt werden. Damit werden störende Aufheizeffekte vermieden und gute Strahlqualität erreicht. Als Pump lasers dienen: Stickstofflaser (337 nm), Kupferlaser (510 nm), Excimerlaser (UV), Rubinlaser (694 nm) oder frequenzvervielfachte Nd:YAG-Laser (532 nm und 355 nm). Diese Pump lasers liefern Pulse im ns-Bereich bei Leistungen zwischen 1–100 MW. Die Vorteile beim Pumpen mit Pump lasers sind folgende: hohe Spitzenleistung im MW-Bereich, kurze ns-Pulse, Pulsfolgefrequenzen über 100 Hz, große Abstimmbereiche insbesondere beim Pumpen mit UV-Lasern. In Abb. 14.12 ist das spektrale Verhalten von Verbindungen gezeigt, die mit Excimerlasern angeregt werden können. Es wird lückenlos der Wellenlängenbereich zwischen 300 und 1000 nm überdeckt.

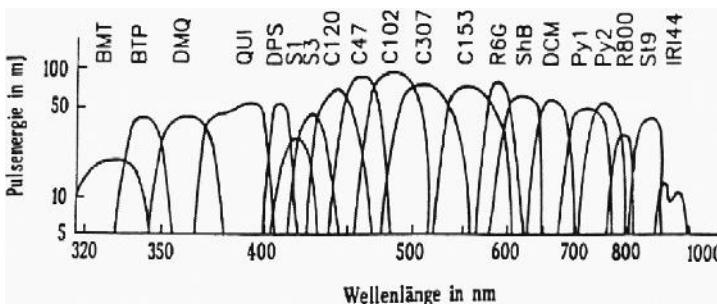


Abb. 14.12. Abstimmungsbereich und typische Pulsennergien verschiedener Farbstoffe beim Pumpen mit Excimerlasern (Datenblatt der Firma Lambda Physik)

Ultrakurze Pulse. In Lasern großer optischer Bandbreite können zahlreiche longitudinale Moden auftreten. Durch das Verfahren der Modenkopplung werden die einzelnen Wellen so überlagert, dass in regelmäßigen Abständen ($t = 2L/c$) kurze Pulse entstehen. Bei kontinuierlich gepumpten Farbstofflasern werden synchrones Pumpen und passive Modenkopplung eingesetzt.

Für das synchrone Pumpen finden modengekoppelte Ionenlaser mit Pulsen von 200 ps Dauer und einer mittleren Leistung von etwa 1 W Verwendung. Voraussetzung für die Erzeugung von ultrakurzen Pulsen ist, dass die optische Resonatorlänge von Pump- und Farbstofflaser bis auf wenige μm gleich sind.

In diesem Fall wird die Verstärkung des Lasermediums mit der Umlauffrequenz des Lichts im Resonator $f = c/2L$ moduliert. Im Gegensatz zur aktiven Modenkopplung werden nicht die Verluste, sondern die Verstärkung moduliert. Im Farbstofflaser entstehen dadurch Pulse, die 2 bis 3 Zehnerpotenzen kürzer als die Pumpimpulse sind, sodass Pulsbreiten um 0,1 ps erzeugt werden können.

Noch kürzere Pulse bis zu 25 fs lassen sich mit passiv modengekoppelten Lasern erzielen. Hierbei wird mit kontinuierlichen Pumpplasern gearbeitet. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, die Längen von Farbstoff- und Pumpaser aufeinander zu stabilisieren. Die Modenkopplung wird durch einen sättigbaren Absorber bewirkt. Eine weitere Verkürzung bis in den Femtosekundenbereich kann durch Pulskompression in Fasern erfolgen. Der Lichtwellenzug besteht dann nur noch aus wenigen Wellenlängen (Tabelle 14.5).

Tabelle 14.5. Erzeugung ultrakurzer Pulse mit Farbstofflasern

Verfahren	Pulsdauer	Länge des Wellenzugs	
Anregung mit Pulslaser	100 ps	500 000	Wellenlängen
Synchrones Pumpen	100 fs	50	Wellenlängen
Passive Modenkopplung	25 ps	12	Wellenlängen
+ Pulskompression	6 fs	3	Wellenlängen

14.2 Festkörperlaser

Das aktive Medium der meisten Festkörperlaser besteht aus Kristall- oder Glasstäben von einigen cm Länge, welche mit optisch wirksamen Ionen dotiert sind. Dabei werden meist Übergangsmetalle wie Cr, Ni, Co oder seltene Erden wie Nd, Er oder Ho verwendet. Die Laserstrahlung entsteht in inneren ungefüllten Schalen, die weitgehend vom Kristallfeld abgeschirmt sind. Die Übergänge sind daher relativ scharf, und sie liegen im infraroten oder sichtbaren Spektralbereich. Daneben gibt es auch vibronisch verbreiterte Niveaus, die zu abstimmbaren Festkörperlasern führen.

Bei der Dotierung werden ein Teil (etwa 10^{-3} – 10^{-1}) der Atome durch Fremdionen ersetzt. Demnach liegt die Dichte der laseraktiven Teilchen bei etwa 10^{19} cm^{-3} , was wesentlich größer ist als die Dichte in Gaslasern (10^{15} – 10^{17} cm^{-3}). Da die Lebensdauer der oberen Laserniveaus oft lang ist, lassen sich große optische Energien in Festkörpern speichern und hohe Pulsleistungen extrahieren. Die Anregung erfolgt durch optisches Pumpen mit Lampen oder Lasern. Das Material des Festkörperlasers, Kristalls oder Glas, muss gute optische, mechanische und thermische Eigenschaften besitzen, z.B. Schlierenfreiheit, Bruchfestigkeit und hohe Wärmeleitfähigkeit. Als Kristalle werden Oxide und Fluoride, als Gläser Phosphate und Silikate eingesetzt.

Beispiele für die Oxide sind Saphir, Granate und Aluminate. Das erste Lasermaterial war der Saphir Al_2O_3 des Rubinlasers. Bei den Granaten sind $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{15}$ (YAG = Yttrium-Aluminium-Granat), $\text{Gd}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}$ (GGG = Gadolinium-Gallium-Granat) und $\text{Gd}_3\text{Sc}_2\text{Ga}_3\text{O}_{12}$ (GSGG = Gadolinium-Scandium-Gallium-Granat) bekannt, welche beim Neodymlaser eingesetzt werden. Von den Aluminaten wird YAlO_3 (YALO) mit Nd, Er Mo oder Tm dotiert und als Lasermedium verwendet. Außerdem werden Wolframate wie $\text{Nd}:\text{CaWO}_4$ und Beryllate wie $\text{Nd}:\text{La}_2\text{Be}_2\text{O}_3$ (BEL) verwendet. Bei den Fluoriden wurden insbesondere CaF_2 und YLiF_4 (YLF) untersucht und mit verschiedenen Ionen dotiert, wie Nd, Ho und Er.

Bei einer speziellen Klasse von Festkörperlasern kann die Energie des Übergangs in Photonen und Phononen, d.h. Gitterschwingungen, aufgeteilt werden. Dieses ermöglicht bei diesen vibronischen Lasern eine breitbandige kontinuierliche Abstimmung der Wellenlänge. Die wichtigsten Vertreter sind der Alexandritlaser ($\text{BeAl}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}$), der Titan-Saphir-Laser ($\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$), der Cr:KZnF₃-Laser, der Smaragdlaser ($\text{Be}_3\text{Al}_2\text{Si}_6\text{O}_{18}:\text{Cr}^{3+}$) und andere.

Eine weitere Klasse der Festkörperlaser stellen die Farbzentrenlaser dar, bei denen Alkalihalogenidkristalle mit Defekten, die eine Färbung der Kristalle hervorrufen, verwendet werden.

Im Folgenden werden die wichtigsten kommerziellen Festkörperlaser diskutiert, deren Wellenlängen im roten bis infraroten Spektralbereich zwischen 0,7 und 3 μm liegen. Im Kap. 14.4 werden der Nd:YLF-Pikosekundenlaser und der Ti:Saphir-Femtosekundenlaser ausführlich behandelt.

14.2.1 Rubinlaser

Der Rubinlaser, historisch der erste Laser, benutzt als aktives Medium einen synthetischen Rubinkristallstab. Dieser besteht aus Al_2O_3 (Saphir), welcher mit Chrom dotiert ist ($\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$). Die Laserübergänge finden in inneren Schalen des Cr^{3+} -Ions statt. Die Anregung erfolgt optisch mittels einer Blitzlampe. Der Rubinlaser ist ein Dreiniveausystem, was nachteilig ist, da etwa 50% der Atome angeregt werden müssen, ehe es zu einer Überbesetzung und Lichtverstärkung kommt. Das verlangt eine hohe Pumpenergie, die in der Praxis nur im Pulsbetrieb erreicht wird. Die Wellenlänge des Rubinlasers (R_1 -Linie) beträgt 694,3 nm bei Zimmertemperatur.

In Abb. 14.13 ist links das Energieniveauschema (Dreiniveaulaser) des Rubinlasers dargestellt. Rechts ist ein typischer Aufbau eines Rubinlasers – entsprechend der erstmaligen Realisierung durch T. Maiman – wiedergegeben.

Der Rubinlaser kann ebenso wie andere Festkörperlaser in folgenden Betriebsarten benutzt werden: Normalbetrieb, Q-Switch und Modenkopplung (Tabelle 14.6). Im Normalbetrieb erfolgt die Emission eines Rubinlasers während des Pumppulses (etwa 1 ms) nicht kontinuierlich, sondern mit starken statistischen Intensitätsschwankungen oder Spikes.

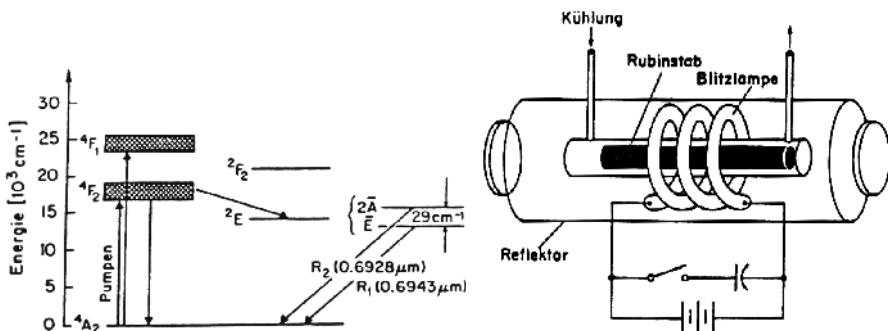


Abb. 14.13. Links: Energieniveauschema des Rubinlasers. Rechts: Typischer Aufbau eines Rubinlasers

Tabelle 14.6. Verschiedene Betriebsarten des Rubinlasers ($\lambda = 694,3 \text{ nm}$)

Betriebsart	Pulsdauer	Pulsleistung	Pulsenergie
Normalpuls	0,5 ms	100 kW	50 J
Q-switch	10 ns	100 MW	1 J
Modenkopplung	20 ps	einige GW	0,1 J

14.2.2 Neodym-YAG-Laser (inkl. Erbium-, Holmiumlaser)

Der wichtigste Festkörperlaser ist der Neodymlaser, bei dem die Strahlung von Nd^{3+} -Ionen erzeugt wird. Das Nd^{3+} -Ion kann in verschiedene Wirtsmaterialien eingebaut werden, wobei für Laserzwecke am häufigsten YAG-Kristalle (Yttrium-Aluminium-Granat – $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) und verschiedene Gläser verwendet werden. Der Nd:YAG-Laser weist eine hohe Verstärkung und geeignete mechanische und thermische Eigenschaften auf, sodass er in zahlreichen kontinuierlichen und gepulsten Versionen eingesetzt wird. Weitere Kristalle für Nd-Laser sind Nd:Cr:GSGG, Nd:YLF, weniger Bedeutung haben YAlO, YAP, CaWO₃ und andere.

Die Anregung erfolgt durch optisches Pumpen in breite Energiebänder und strahlungslose Übergänge in das obere Laserniveau. Der Nd-Laser ist ein Vierniveausystem mit dem Vorteil einer vergleichsweise geringen Laserschwelle. Unter üblichen Betriebstemperaturen emittiert der Nd:YAG-Laser nur die stärkste Linie mit einer Wellenlänge von $1,0641 \mu\text{m}$. Durch Verwendung dispersiver Elemente im Resonator, wie Etalon, Prisma, selektive Spiegel, können auch zahlreiche andere Linien entstehen.

In Abb. 14.14 ist das Energieniveauschema (Vierniveaulaser) des Nd:YAG-Lasers dargestellt. In Abb. 14.15 ist ein typischer Aufbau eines Nd:YAG-Lasers wiedergegeben.

Handelsübliche YAG-Laserstäbe haben eine Länge bis zu 150 mm und einen Durchmesser bis 10 mm. Mit einem 75 mm langen YAG-Laserstab von

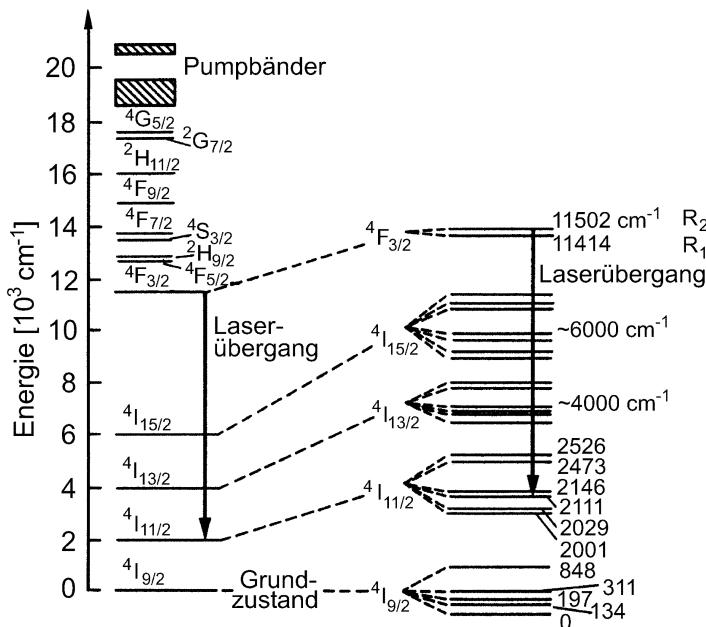


Abb. 14.14. Energieniveauschema des Nd:YAG

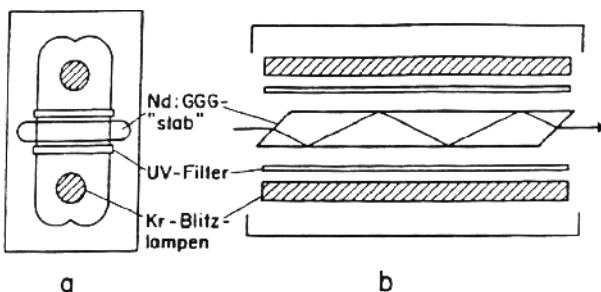


Abb. 14.15. Typischer Aufbau einer „slab“-Geometrie. (a) Querschnitt (b) Seitenansicht

6 mm Durchmesser kann eine Ausgangsleistung von etwa 300 W bei einem Wirkungsgrad bis zu 4,5% erreicht werden. Die Laserschwelle liegt bei etwa 2 kW elektrischer Pumplampenleistung (Kr-Bogenlampe). Eine bessere Anpassung und ein höherer Wirkungsgrad wird beim Pumpen mit GaAs-Diodenlasern erreicht, die zwischen 805 und 809 nm emittieren (s. Kap. 14.3). Die Laser können kontinuierlich oder gepulst strahlen (Tabelle 14.7).

Tabelle 14.7. Verschiedene Betriebsarten des Nd:YAG-Lasers ($\lambda = 1,06 \mu\text{m}$)

Anregung	Betriebsart	Pulsfrequenz	Pulsdauer	Leistung
cw				
cw	Q-switch	0 ... 100 kHz	0,1 ... 0,7 μs	100 kW
cw	cavity dumping	0 ... 5 MHz	10 ... 50 ns	
cw	Modenkopplung	100 MHz	3 ... 100 ps	
.....				
Puls	Normalpuls	bis 200 Hz	0,1 ... 10 ms	10 kW
Puls	Q-switch	bis 200 Hz	3 ... 30 ns	10 MW
Puls	cavity dumping	bis 200 Hz	1 ... 3 ns	10 MW
Puls	Modenkopplung	bis 200 Hz	30 ps	einige GW

Cr:Nd:GSGG-Laser. Neben dem YAG gibt es für Neodym noch eine Vielzahl anderer kristalliner Wirtsmaterialien. Im Fall von Nd:Cr:Gd₃Sc₂Ga₃O₁₂ (GSGG) werden die breiten Absorptionsbanden des Chrom (Cr³⁺) im Sichtbaren für den Pumpprozess ausgenutzt. Der eigentliche Laserprozess findet im Neodym (Nd³⁺) statt. Dabei findet ein effektiver Energietransfer von nahezu 100% von Cr³⁺ auf das obere Laserniveau des Nd³⁺ statt. Dies führt zu einer Steigerung des Wirkungsgrads auf 5%. Die stärkste Wellenlänge liegt wie beim YAG bei 1,06 μm . Nachteilig ist, dass Wärmeleitfähigkeit und Wärmekapazität etwas kleiner als beim YAG-Kristall sind, während sich die anderen Materialeigenschaften ähneln. Die Verstärkung ist etwas geringer und die Sättigung etwas höher.

Nd:YLF. Im Unterschied zu den YAG- und GSGG-Neodym-Lasern liefert der Nd:LiYF₄ eine starke Linie bei 1,053 μm . Durch Drehen eines Polarisators im Resonator kann die 1,047- μm -Linie eingestellt werden. Beide Linien sind senkrecht zueinander polarisiert. Die 1,053- μm -Strahlung wird durch Neodym-Phosphatgläser verstärkt, sodass derartige Kombinationen aus Oszillator und Verstärker eingesetzt werden. Der Nd:YLF-Laser kann auch bei 1,313 und 1,321 μm betrieben werden.

Nd:Glas-Laser. Anstelle von Kristallen können auch Gläser, z.B. Silikat- oder Phosphatglas, als Nd-dotierte Lasermedien eingesetzt werden. Die Gläser werden bis zu einigen Gewichtsprozenten und damit stärker dotiert als Kristalle und mit größeren Abmessungen hergestellt. Damit können Pulse mit hohen Energien und Leistungen erzielt werden. Die Pulsfolgefrequenz ist allerdings kleiner als beim YAG-Laser, da die Wärmeleitfähigkeit geringer ist. Die Linienbreite ist wegen der amorphen Struktur des Glases etwa 50-mal größer als beim YAG-Kristall. Dadurch können kürzere Pulse entstehen, da bei Modenkopplung die Pulsbreite durch die reziproke Linienbreite begrenzt ist. Handelsübliche Gaslaser haben Pulsfolgefrequenzen, die meist unterhalb von

1 Hz liegen. Als Beispiel dienen folgende Betriebsdaten für einen Laser mit einem 15 cm langen Glasstab von 1,2 cm Durchmesser: bei 5 kJ Pumpenergie werden etwa 70 J Laserenergie emittiert. Die Wellenlänge liegt um 1,06 μm .

Erbiumlaser. Neben dem Rubin- und Neodymlaser werden auch der Holmiumlaser (2,06 μm) und Erbiumlaser (0,85 μm , 1,2 μm , 1,7 μm , 2,7–2,9 μm) kommerziell hergestellt. Bezuglich Wirkungsgrad und Ausgangsenergie zeichnet sich der Erbiumlaser nicht besonders aus. Er wird jedoch eingesetzt, da neue Wellenlängen um 2,9 und 1,54 μm zur Verfügung stehen. Der Er-Laser wird wie die anderen Festkörperlaser mit Blitzlampen gepumpt, wobei Pulsennergien im 10 mJ-Bereich entstehen. Als Wirkskristalle dienen YAG, YLF (= YLiF_4) und YAlO_3 , Erbium kann auch in Gläser eingebbracht werden, die dann Lasertätigkeit bei 1,54 μm zeigen. Anwendungen des Lasers bei 1,54 μm sind augensichere Entfernungsmesser; 3- μm -Laser werden zu Photoblation in der Medizin eingesetzt.

Holmiumlaser. Holmium kann in die gleichen Wirkskristalle wie beim Erbiumlaser eingebaut werden. Es entsteht Laserstrahlung hauptsächlich um 2,1 μm , sowie auch zahlreiche andere Linien. Bei Temperaturen des flüssigen Stickstoffs ist ein kontinuierlicher Betrieb möglich. Bei Zimmertemperatur können intensive Pulse bis zu 500 mJ, auch im Q-Switch-Betrieb, erzeugt werden.

Vibronische Festkörperlaser. Paramagnetische Ionen, insbesondere der Übergangsmetalle wie Cr, Co, Ni, weisen eine nichtaufgefüllte 3d-Schale auf. Beim Einbau dieser Ionen in Festkörper ist die Abschirmung vom Kristallfeld durch äußere Schalen schwächer als bei den seltenen Erden (Nd-Laser). Daraus tritt eine stärkere Wechselwirkung zwischen diesen Ionen und dem Wirkskristall auf. Ähnlich wie bei Farbstoffen können elektronische Übergänge in verschiedene Schwingungszustände aufspalten und ein Kontinuum bilden. Die optischen Spektren zeigen sowohl scharfe elektronische sowie auch breitbandige vibronische Übergänge. Wie beim Farbstofflaser ist damit die Möglichkeit gegeben, kontinuierlich abstimmbare Systeme zu bauen. Der Abstimmbereich kann über 30% von der zentralen Wellenlänge betragen.

14.2.3 Halbleiterlaser

Kurz nach der Realisierung des ersten Lasers wurde bereits 1961 über den Halbleiterlaser berichtet. Er ist von großem wirtschaftlichen Interesse und wird bereits jetzt in großen Stückzahlen in Konsumartikeln wie digitalen Musikrecordern und Druckern eingesetzt. Die bedeutendsten Eigenschaften im Vergleich zu anderen Lasern sind kleine Abmessungen, direkte Anregung durch Strom, hoher Wirkungsgrad, Integrierbarkeit mit elektronischen Bauelementen und Herstellung durch die Halbleitertechnologie.

Halbleiter- oder Diodenlaser, welche direkt durch elektrischen Strom gepumpt werden, können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Laser aus III-V-Verbindungen wie GaAs strahlen im Gelben, Roten und nahen Infraroten zwischen 600 und 1700 nm. Derartige Laser können kontinuierlich und gepulst bei Zimmertemperatur bis zu einigen mW und Wirkungsgraden bis 50% betrieben werden. Dagegen strahlen die Bleisalzdiodenlaser im mittleren Infraroten zwischen 3 und 30 μm ; sie können nur bei tiefen Temperaturen $T < 100 \text{ K}$ angeregt werden.

GAAlAs- und InGaAsP-Laser. In Halbleitern sind die Energiezustände der Elektronen nicht scharf, wie in Gasen, sondern durch breite Bänder gegeben. Der Laserübergang findet ähnlich wie bei Leuchtdioden zwischen dem Leitungs- und Valenzband statt. In Abb. 14.16 links ist das Energieniveauschema in einem idealen Halbleiter dargestellt.

In Abb. 14.16 ist eine p - n -Laserdiode mit angelegter Spannung V in Durchlassrichtung wiedergegeben. Die Fermi-Energie F_n der n -Region ist gegenüber der Fermi-Energie F_p der p -Region um den Betrag $e\text{V}$ angehoben. In Abb. 14.17 ist der schematische Aufbau eines p - n -Diodenlasers dargestellt. Abbildung 14.18 gibt die Multilayerstruktur eines technischen Halbleiterlasers wieder.

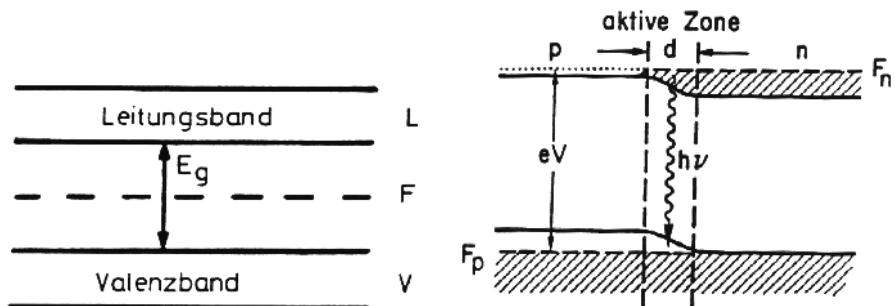


Abb. 14.16. Links: Valenzband V , Fermi-Niveau F und Leitungsband L eines idealen Halbleiters. Rechts: p - n -Übergang mit angelegter Spannung V in Durchlassrichtung $V = E_{\text{gle}} = 1,5 \text{ V}$ für GaAs

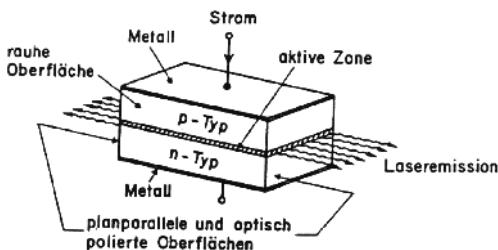


Abb. 14.17. Schematischer Aufbau eines p - n -Diodenlasers. Die aktive Zone ist schraffiert dargestellt

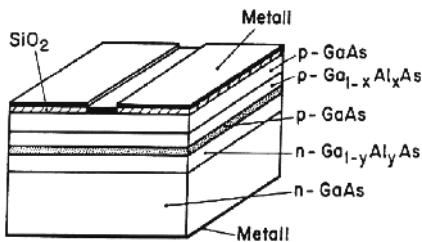


Abb. 14.18. Doppelheterostruktur eines technischen Halbleiterlasers

Die Wellenlängen der Laserdioden hängen vom Bandabstand des Halbleiters ab. In binären Halbleitern aus zwei Komponenten hat der Bandabstand einen festen Wert, der bei GaAs 1,4 eV beträgt, was einer Wellenlänge von 0,9 μm entspricht. Bei Halbleitern aus drei oder vier Komponenten kann durch das Mischungsverhältnis der Bandabstand variiert werden. Im Fall von GaAlAs liegt die Variation zwischen 0,9 und 0,7 μm . Für den Halbleiter InGaAsP ist der Wellenlängenbereich größer.

Für Diodenlaser sind Halbleiter mit direkten Bandabständen erforderlich. Eine weitere Einschränkung ist, dass Halbleiterschichten am einfachsten auf Substraten epitaktisch aufgewachsen werden, die etwa gleiche atomare Gitterkonstanten besitzen. Aus diesem Grund lässt sich $\text{Ga}_{1-x}\text{Al}_x\text{As}$ auf GaAs und $\text{In}_{1-x}\text{Ga}_x\text{As}_y\text{P}_{1-y}$ mit $0 \leq x \leq 1$ und $y \approx 2,2x$ auf InP gut produzieren. Derartige InGaAsP-Laser können im Bereich von 1000 bis 1700 nm hergestellt werden. Kürzere Wellenlängen bis 0,65 μm , d.h. rotes sichtbares Licht, kann mit InGaAsP auf InGaP erzeugt werden. Gelbe Diodenlaser bis 570 nm verwenden AlGaInP.

Beim Fertigungsprozess ist eine genaue Kontrolle der Wellenlänge des Lasers nur innerhalb einer Unsicherheit von $\pm 20\text{--}30\text{ nm}$ möglich. Für die Nachrichtenübertragung sind Wellenlängen um 1,3 und 1,6 μm besonders geeignet, da optische Fasern in diesem Bereich eine minimale Dämpfung und Dispersion aufweisen. GaAlAs-Laser um 780 nm werden in großen Stückzahlen für die optische Abtastung von Tonträgern eingesetzt. Tabelle 14.8

Tabelle 14.8. Typische Daten von Halbleiterlasern im kontinuierlichen Betrieb

Lasertyp	Wellenlänge (μm)	Temperatur (K)	Leistung (mW)	Schwellenstrom (mA)
InGaAsP/InGaP	0,65...0,7	300	10	100
GaAlAs	0,78...0,88	300	100	10
InGaAsP	1,2...1,6	300	50	10
PbCdS	2,8...4,2	300	1	500
PbSSe	4,0...8,5	100	1	500
PbSnTe	6,5...32	100	1	500
PbSnSe	8,5...32	100	1	500

zeigt eine Übersicht über einige kontinuierliche Halbleiterlaser. Wegen der geringen Abmessungen des aktiven Volumens strahlen Halbleiterlaser unter einem Divergenzwinkel von 20–40°. Da es sich um kohärentes Licht handelt, kann die Divergenz mittels Linsen in den mrad-Bereich verkleinert werden.

Diodenarrays. Auf einem Träger können mehrere Streifenlaser parallel nebeneinander angeordnet werden, wodurch „Arrays“ gebildet werden. Diese liefern kontinuierliche Leistungen bis zu 100 W. Eine wichtige Anwendung besteht im Pumpen von Festkörperlasern, insbesondere Nd-Lasern.

14.3 Diodengepumpte Festkörperlaser

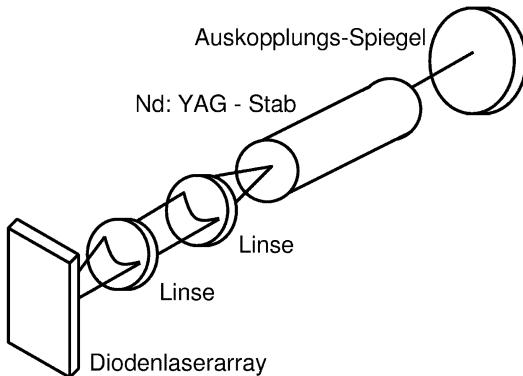
Oft werden diodengepumpte Laser als Oszillatoren eingesetzt. Die Pumpstrahlung aus Diodenlaserarrays wird mit Hilfe von Linsen meist axial in den Nd-Stab eingestrahlt. Die Pumpstrahlung dringt tief in den Laserstab ein und wird nahezu vollständig absorbiert. Typische lasergepumpte Nd:YAG-Systeme benutzen Diodenarrays mit einigen Watt kontinuierlicher Laserleistung bei einem Wirkungsgrad um 20%. Der Laserstab ist ungefähr 1 cm lang mit einem Durchmesser von 0,5 mm. In kommerziellen Systemen ist der Quantenwirkungsgrad nahe bei 1, d.h. fast jedes Pumpphoton erzeugt ein Laserphoton. Der gesamte Wirkungsgrad eines diodenlasergepumpten Nd:YAG-Systems liegt um 7%. Da eine Erwärmung erheblich reduziert wird, liefern derartig gepumpte Laser eine sehr gute Strahlqualität im kontinuierlichen Betrieb von über 100 mW in der TEM₀₀-Mode.

Es werden kommerzielle Systeme hergestellt, in deren Resonator ein Kristall zur Frequenzverdopplung eingebaut ist. Bei einer Umwandlungsrate von nahezu 100% entsteht damit kontinuierliche grüne Strahlung (0,53 μm) im TEM₀₀-Mode um 100 mW. Diodengepumpte Neodymlaser können auch in Güteschaltung und Modenkopplung betrieben werden. Neben dem Nd:YAG werden auch anderen Laserkristalle mit Laserdioden gepumpt. Derartige Festkörperlaser sind ein entscheidender Fortschritt in der Lasertechnologie, durch welchen Strahlung mittlerer Leistung im Infraroten und Sichtbaren mit hoher Strahlqualität und gutem Wirkungsgrad erzeugt wird.

Diodengepumpter Nd:YAG-Laser. Die zum Pumpen von Nd:YAG verwendeten Diodenlaser sind GaAs-Laser mit einer Emissionswellenlänge zwischen 805 und 809 nm, die mit einem der Pumpbänder von Nd:YAG zusammenfällt. Bei der Anregung mit Diodenlasern wird im Gegensatz zu den anderen Pumpquellen die gesamte optische Pumpenergie vom Nd:YAG-Kristall in dessen Pumpband absorbiert. Die Erwärmung des Kristalls wird dadurch erheblich reduziert und der totale Wirkungsgrad beträchtlich verbessert, wie Tabelle 14.9 zeigt.

Tabelle 14.9. Vergleich verschiedener Pumpquellen für den Nd:YAG-Laser

	Edelgas-Bogenlampe	Wolframlampe	Diodenlaserarray
Elektrische Eingangsleistung der Pumpquelle	2 kW	500 W	1 W
Nutzbare Pumpleistung	100 W	5 W	0,2 W
Laserleistung (TEM ₀₀)	8 W	0,23 W	0,06 W
Totaler Wirkungsgrad	0,4 %	0,04%	6%
Typ. Lebensdauer der Pumpquelle	400 h	100 h	5000 h

**Abb. 14.19.** Geometrische Anordnung eines diodenlasergepumpten Nd:YAG-Lasers

Für diodenlasergepumpte Nd:YAG-Laser werden Diodenlaserarrays verwendet. Das Pumplicht wird nicht seitlich eingekoppelt wie bei den blitzlampengepumpten Nd-Lasern sondern auf die eine Stirnfläche des Laserstabs fokussiert wie Abb. 14.19 zeigt.

Die gesamte Kavität ist nur wenige cm lang, und eine Wasserkühlung erübrigt sich. Bisher wurden diodenlasergepumpte Nd:YAG-Laser vorwiegend kontinuierlich betrieben. Ihr Einsatz ist momentan bei jenen Anwendungen gegeben, wo relativ niedrige Leistungen aber hohe Ansprüche beispielsweise an die Frequenzstabilität gestellt werden.

14.4 Ultrakurzpuls laser

14.4.1 Pikosekundenlaser im IR, sichtbaren und UV-Spektralbereich¹

Pikosekundenlaser mit hohen Pulsenergien setzen sich aus einem moden gekoppelten Oszillator und einem regenerativen Verstärker zusammen (s. Abb. 14.20).

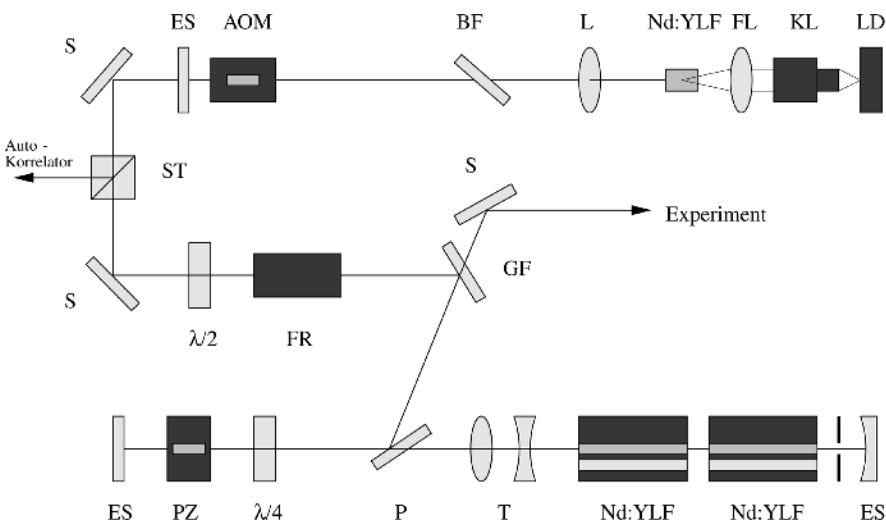


Abb. 14.20. Aufbau eines Lasersystems mit Oszillator und regenerativem Verstärker zur Erzeugung von ps-Laserpulsen. *LD* Laserdiode, *KL* Kollimatorlinse, *FL* Fokussierlinse, *L* Linse, *BF* Brewster-Fenster, *AOM* akustooptischer Modulator, *ES* Endspiegel, *S* Spiegel, *ST* Strahlteiler, $\lambda/2$ $\lambda/2$ -Plättchen, *FR* Faraday-Rotator, *PZ* Pockel-Zelle, *P* Polarisator, *T* Teleskop, *GF* Glasfenster

Der Oszillator. Die Erzeugung der Pulse im Oszillator basiert auf der aktiven Modenkopplung. Dazu befindet sich im Oszillator ein akustooptischer Modulator (AOM), bestehend aus einem LiNbO_3 -Kristall. Auf diesen wird über einen Frequenzgenerator ein auf 3–4 W verstärktes 80-MHz-Sinus-Signal gegeben. Dadurch wird im Kristall ein stehendes Dichtegitter induziert, welches eine Beugung der an kommenden Laserstrahlung zur Folge hat. Nur während der zweimaligen Nulldurchgänge einer Periode kann das Licht unbeeinflusst den Kristall durchdringen. Entspricht der Frequenzabstand benachbarter Moden ($\Delta\nu = c/2L$) dieser Modulationsfrequenz der Resonatorgüte,

¹ Der Abschnitt Pikosekundenlaser und Frequenzvervielfachung wurde auszugsweise aus der Diplomarbeit „Frequenzvervielfachung an einem Pikosekundenlasersystem zur Ablation von Corneagewebe“ von Dipl.-Phys. Ralf Kessler entnommen.

so kommt es zur Modenkopplung, d.h. den Moden wird eine bestimmte Phasenbeziehung aufgeprägt. Damit ist die Voraussetzung für die Bildung kurzer Laserpulse gegeben. Die so erzeugten Pulse haben eine Länge von ca. 30 ps. Die äußerst intensitätsschwachen Pulse des Oszillators werden nach Verlassen des Oszillators in den Resonator eingekoppelt (*Seeding*), wo sie um einen Faktor 10^6 verstärkt werden. Der verwendete Faraday-Rotator (FR) dient dazu, vom Resonator ausgetrennte, intensitätsstarke Pulse, die störende Einflüsse auf den Oszillator hätten, abzublocken.

Der regenerative Verstärker. Die Aufgabe des regenerativen Verstärkers ist es, die leistungsschwachen Pulse zu verstärken.

In die Laserköpfe sind jeweils ein ca. 8 cm langer Nd:YLF-Laserstab und parallel dazu eine Kryptonblitzlampe integriert. Die Blitzlampen dienen unter cw-Betrieb zum Pumpen des Lasermediums auf der gesamten Stablänge. Die so erreichte Inversion kann schließlich vom eingekoppelten Puls abgebaut werden, sodass dieser verstärkt wird. Das Verstärkungsprofil des umherlaufenden Pulses kann mit Hilfe einer schnellen Photodiode hinter einem der Endspiegel aufgenommen werden (s. Abb. 14.21a). Der zeitliche Abstand der einzelnen Peaks von ca. 7 ns entspricht der Dauer für einen einzelnen Resonatorumlauf. Die Einhüllende trägt die Form eines Q-switch-Laserpulses. Das bedeutet, dass der eingekoppelte Puls eine zeitliche Verstärkung erfährt, die

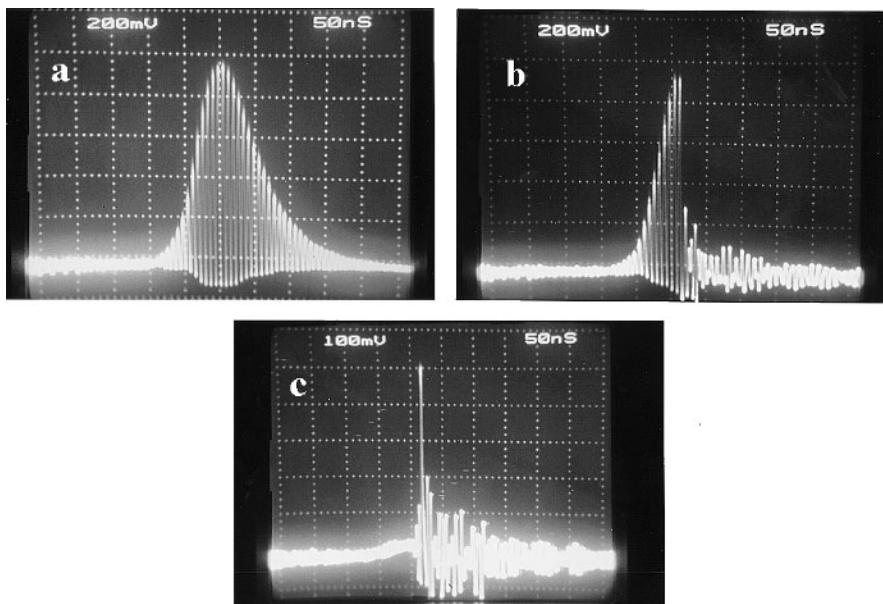


Abb. 14.21. Funktionsweise des Lasers. (a) Verstärkungsprofil des regenerativen Verstärkers, (b) Dumping, (c) ausgetrennter ps-Laserpuls

dieser Form gleichkommt. Man ist also bestrebt, den Puls dann auszukoppeln (man spricht auch vom *Dumping*), wenn er maximal verstärkt wurde. Bei späterem Auskoppeln käme es bereits wieder zur Abnahme der Inversion, sodass auch die Verstärkung nachlassen würde.

Das Prinzip des Ein- und Auskoppelns basiert auf einer Polarisations schaltung mit Hilfe der Pockel-Zelle und des polarisierenden Strahlteilers. Das Schalten der Pockel-Zelle muss sehr schnell vonstatten gehen, um möglichst nur einen Puls mit viel Energie zu erhalten. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom *Kontrastverhältnis des Pockel-Kristalls*. Dieses Kontrastverhältnis konnte ebenfalls mit einer schnellen Photodiode aufgenommen werden und ist in Abb. 14.21c zu sehen. Man liest ein Verhältnis von ca. 5:2 ab, d.h. es werden bereits fast 30% der Energie im nächsten Puls mit ausgekoppelt. Dieses eher schlechte Kontrastverhältnis lässt sich auf einen Schaden im Pockel-Kristall zurückführen. Durch Einbau eines neuen Kristalls sollte sich ein deutlich besseres Verhältnis ergeben. Die angesprochenen Schäden im Kristall bzw. auf dessen Oberfläche sind auf die hohen Intensitäten der Pulse während der Resonatorumläufe zurückzuführen. Um knapp unter der Zerstörschwelle von LiNbO_3 zu bleiben, befindet sich deshalb ein Teleskop im Strahlengang, das den Strahl aufweitet und somit eine geringere Leistungsdichte im Kristall erzeugt.

Der Autokorrelator. Zur Messung der Pulslänge dient ein Autokorrelationssystem (Abb. 14.22). Über einen Strahlteiler werden 50% des Pulses nach dem Verlassen des Oszillators ausgekoppelt dem Autokorrelator zugeführt. Dieser arbeitet nach dem Prinzip eines Michelson-Interferometers: der Laserstrahl trifft über einen halbdurchlässigen Spiegel einerseits auf einen fahrbaren Spiegel, andererseits auf ein Prisma, das ihn parallel zum ursprünglichen Strahl verschiebt. Die so produzierten parallelen Strahlen werden auf einen frequenzverdoppelnden BBO-Kristall fokussiert. Man erhält bei geeignetem Winkel zwischen Kristall und Laserstrahl jeweils eine Welle mit doppelter Frequenz, deren Wellenlänge ($\lambda = 526 \text{ nm}$) im sichtbaren Bereich liegt (Abb. 14.23).

Kommt es zudem zu einer zeitlichen Überlagerung der beiden Pulssüge, so generiert man wiederum bei einem bestimmten Winkel eine zusätzliche frequenzverdoppelnde Welle, um die Phasenverschiebung der Pulse zueinander zu variieren, wird der Spiegel mechanisch vor- und zurückgefahren, so dass sich während einer kompletten Periode die Pulse zweimal vollständig überlagern können, d.h. zweimal grünes Licht produzieren. Dieses Licht wird mit einem Photomultiplier detektiert. Über ein Oszilloskop lässt sich das Signal betrachten. Triggert man auf die Spiegelbewegung, so erhält man zwei Gauß-Kurven, deren Breite ein Maß für die zeitliche Länge der Überlagerung und damit für die Pulslänge ist. Ein typisches Autokorrelationssignal ist in Abb. 14.24 zu sehen. Die wichtigsten Parameter des Systems sind in Tabelle 14.10 aufgelistet.

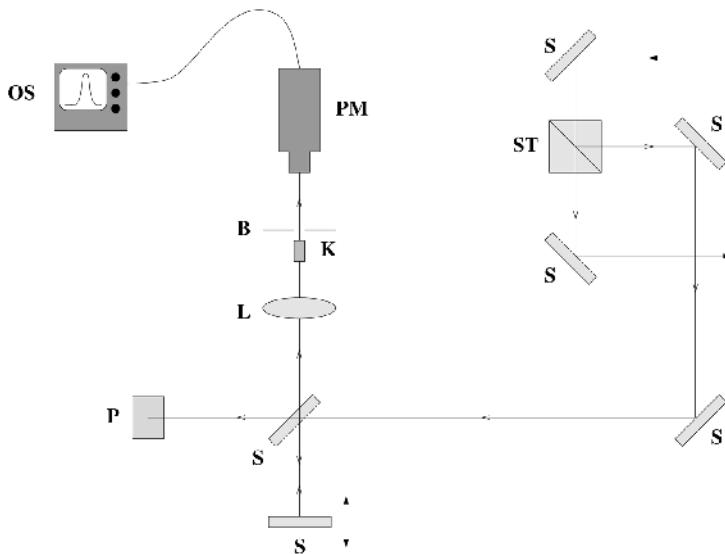


Abb. 14.22. Strahlverlauf im Autokorrelationssystem. *S* Spiegel, *ST* Strahlteiler, *L* Linse, *P* Prisma, *K* Kristall, *B* Blende, *PM* Photomultiplier, *OS* Oszilloskop

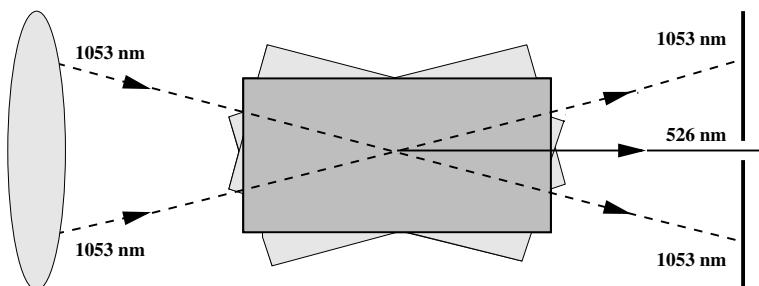


Abb. 14.23. Prinzip der Autokorrelationsmessung

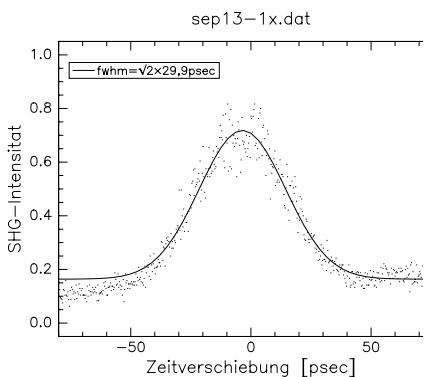


Abb. 14.24. Autokorrelationssignal des ausgekoppelten ps-Laserpulses

Tabelle 14.10. Laserdaten: 1,5 W ps Nd:YLF-System

Parameter	Wert	Anmerkung
Lasermedium	Nd:YLF	Die Wahl des Lasermediums fiel auf Nd:YLF wegen dessen geringerer thermischen Linse sowie größerer spektralen Bandbreite, verglichen mit dem weit verbreiteten Nd:YAG.
Wellenlänge [nm]	1053 (σ)	Aufgrund der Anisotropie von Nd:YLF können zwei unterschiedlich polarisierte Wellen entstehen. Die verwendete Wellenlänge von 1053 nm hat eine geringere thermische Linse als bei 1047 nm und wurde deshalb bevorzugt. Außerdem sind die Verluste beim Einsatz der preislich günstigeren Standardoptiken für Nd:YAG ($\lambda = 1064$ m) geringer.
	1047 (π)	
Pulslänge [ps]	≈ 30	Aufgrund von Dispersionseffekten der Laserstäbe kommt es zu einer Pulsverbreiterung im Verstärker. Diese Verbreiterung beträgt allerdings weniger als 25%.
Ausgangsenergie [mJ]	1,5	
Repetitionsrate [Hz]	bis 1000	Durch Manipulation des Ein- und Ausschaltens der Pockel-Zelle kann man die Pulswiederholrate vom Einzelschuss bis hin zu einem kHz variieren.
Strahldurchmesser [mm]	$\approx 2,5$	Das Strahlprofil ist nicht vollkommen kreisförmig, jedoch differiert der horizontale vom vertikalen Durchmesser um weniger als 15%.

Erzeugung der 2., 4. und 5. Harmonischen des Nd:YLF-Pikosekundenlasersystems. Theoretische Grundlage zur Frequenzvervielfachung bildet die Polarisation, die sich bei Vorhandensein eines elektrischen Feldes im Material einstellt. Dabei verschieben sich die leichten Elektronen relativ zu den schwereren Kernen, und es bildet sich ein Dipolmoment. Als Polarisation bezeichnet man das Dipolmoment pro Volumeneinheit. Bei kleinen Feldstärken ergibt sich für isotrope Medien eine lineare Abhängigkeit der Polarisation von der Feldstärke:

$$\mathbf{P} = \chi \mathbf{E}. \quad (14.4)$$

Diese Gleichung beinhaltet allerdings nur das erste Glied einer Potenzreihenentwicklung in \mathbf{E} und stellt deshalb nur eine Näherung dar. Hat man es dagegen mit starken Feldern zu tun, darf man die höheren Glieder der Entwicklung nicht mehr vernachlässigen.

$$\mathbf{P} = \chi^{(1)} \mathbf{E} + \chi^{(2)} \mathbf{E}^2 + \chi^{(3)} \mathbf{E}^3 + \dots \quad (14.5)$$

Dabei bezeichnet $\chi^{(n)}$ die Suszeptibilität n -ter Ordnung. Die Suszeptibilitäten höherer Ordnung sind ein Maß für die nichtlinearen Rückstellkräfte, die an der verschobenen Elektronenhülle angreifen. Liegt der Wert für $\chi^{(1)}$ noch nahe bei eins, so fällt er bei den höheren Ordnungen doch sehr stark ab (z.B. $\chi^{(2)} \approx 10^{-10} \text{ cm/V}$), sodass die Näherung in (14.4) für schwache Felder gerechtfertigt ist. Bei gepulsten Laserstrahlen können jedoch leicht Felder in der Größenordnung von 10^8 V/cm erreicht werden, sodass dann (14.4) keine gute Beschreibung mehr darstellt.

Der Suszeptibilitätstensor 3. Stufe $\chi^{(2)}$ ist verantwortlich für SHG (second harmonic generation) sowie für den Pockel-Effekt. Er verschwindet in Kristallen mit zentraler Symmetrie. Somit ist in isotropen Medien keine Frequenzverdopplung möglich. Im Allgemeinen besteht $\chi^{(2)}$ aus 27 Komponenten, von denen jedoch aus Symmetriegründen nur 18 unabhängig voneinander sind. Sie werden meist in einer 6×3 -Matrix d_{lm} dargestellt. Bei geeigneter Kristallorientierung und Polarisation des E-Vektors kann man die Matrix auf eine skalare Größe d_{eff} reduzieren. d_{eff} steht also in direktem Zusammenhang mit der Effizienz der Frequenzumwandlung.

Die Erzeugung der 2. Harmonischen lässt sich mit einem Zweistufenprozess deuten. Zuerst wird, wie oben bereits erwähnt, eine Polarisationswelle mit der doppelten Grundfrequenz erzeugt, deren Phasengeschwindigkeit und Wellenlänge im Medium vom Brechungsindex n_1 für die Fundamentalfrequenz abhängt ($\lambda_p = c/2\nu_1 n_1$). Im zweiten Schritt wird die Energie der Polarisationswelle in eine elektromagnetische Welle mit verdoppelter Frequenz transferiert. Die Phasengeschwindigkeit und die Wellenlänge dieser Welle wird über den Brechungindex n_2 für die verdoppelte Frequenz festgelegt ($\lambda_2 = c/2\nu_1 n_2$). Für einen effektiven Energietransfer ist es notwendig, dass die beiden Wellen konstruktiv miteinander interferieren, also in Phase bleiben, was eine Gleichheit der Brechungsindizes erfordert.

Da fast alle Materialien normale Dispersion im optischen Bereich zeigen, wird die elektromagnetische Welle sich langsamer ausbreiten als die Polarisationswelle. Ausgedrückt in einer Wellenzahldifferenz erhält man für die Phasendifferenz:

$$\Delta k = \frac{4\pi}{\lambda_1} (n_1 - n_2). \quad (14.6)$$

Löst man die Maxwell-Gleichungen für eine Fundamentalwelle und eine Welle mit doppelter Frequenz, die sich beide in einem nichtlinearen Medium ausbreiten, so erhält man für das Verhältnis der Intensitäten beider Wellen, ausgedrückt in Leistungseinheiten, folgenden Zusammenhang [2]

$$\frac{P_{2\omega}}{P_\omega} = \tanh^2 \left[l\sqrt{K} \sqrt{\frac{P_\omega}{A}} \frac{\sin(\Delta k l/2)}{\Delta k l/2} \right], \quad (14.7)$$

wobei $K = 2\eta^3 \omega_1^2 d_{\text{eff}}^2$, l die Kristalllänge und A die Strahlfläche bedeuten. $\eta = \sqrt{\mu_0/\epsilon_0 \epsilon}$ definiert die Wellenimpedanz.

Für kleine Konversionsraten kann man (14.7) entwickeln ($\tanh^2 x \approx x^2$) und erhält:

$$\frac{P_{2\omega}}{P_\omega} = l^2 K \frac{P_\omega}{A} \frac{\sin^2(\Delta kl/2)}{(\Delta kl/2)^2}. \quad (14.8)$$

Anhand von (14.7) bzw. (14.8) erkennt man wiederum, dass bei gleichen Brechungsindizes der sin-Term und damit die Konversionsrate maximal wird.

Prinzip der Phasenanpassung. Die Bedingung einer konstanten Phasenbeziehung zwischen Polarisationswelle und elektromagnetischer Welle kann man unter Ausnutzung der natürlichen Doppelbrechung eines Materials realisieren. Dieses Prinzip soll im Folgenden veranschaulicht werden.

Ein- und zweiachsige Kristalle besitzen eine natürliche Doppelbrechung. Diese Kristalle haben einen polarisationsabhängigen Brechungsindex. Definiert man sich eine Ebene durch die Einfallrichtung des Strahls und der optischen Achse des Kristalls, so gilt folgender Sachverhalt: Ein senkrecht zu dieser Ebene (ordentlicher Strahl) linear polarisierter Strahl erfährt einen anderen Brechungsindex als ein in der Ebene (außerordentlicher Strahl) polarisierter Strahl. Der Brechungsindex für den außerordentlichen Strahl hängt zudem noch von der Einfallrichtung, d.h. vom Winkel zwischen Einfallrichtung und optischer Achse ab. Graphisch lassen sich die hier beschriebenen Verhältnisse gut in Form eines Brechungsindexellipsoids darstellen (s. Abb. 14.25).

Die k -Vektoren, die immer senkrecht auf der Ellipsoidbegrenzung stehen, definieren die jeweilige Einfallrichtung, z kennzeichnet die optische Achse des Kristalls. Der Abstand Nullpunkt-Ellipsoid-Begrenzung gibt den Betrag des

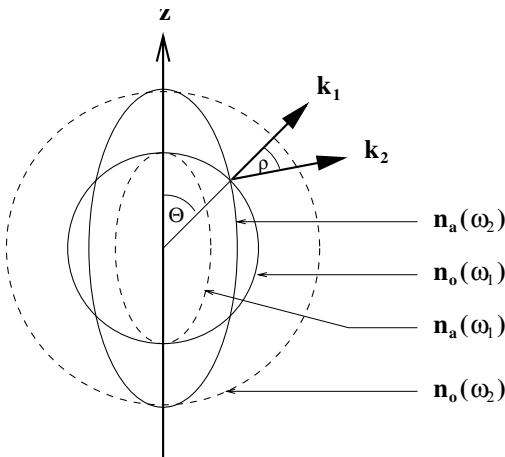


Abb. 14.25. Querschnitt durch den Indexellipsoid eines negativ doppelbrechenden einachsigen Kristalls für zwei verschiedene Frequenzen, ω_1 und ω_2

Brechungsindex an, der sowohl frequenz- als auch winkelabhängig ist. Man erkennt, dass das Ellipsoid für ordentliche Strahlen in Form einer Kugel entartet, was die Unabhängigkeit des Brechungsindex von der Einfallsrichtung widerspiegelt. Die für die Frequenzvervielfachung wichtigen Kurven $n_o(\omega_1)$ und $n_a(\omega_2)$ sind durchgehend gezeichnet. Dort, wo sich beide Kurven schneiden, ist die Bedingung der Indexgleichheit erfüllt. An diesen Punkten erfolgt also eine vollständige Kompensation der Dispersion durch die Polarisationsabhängigkeit des Brechungsindex.

Die Bedingung $\Delta k = 0$ entspricht im Photonenbild der Impulserhaltung:

$$\Delta k = k_{\omega_1} + k_{\omega_2} - k_{2\omega} = 0. \quad (14.9)$$

Ersetzt man k durch $\frac{n\omega}{c}$, so erhält man für die beiden Typen der Phasenanzapfung:

$$\begin{aligned} \text{Typ I } o + o \rightarrow a \quad n_o(\omega) &= n_a(2\omega) \\ \text{Typ II } o + a \rightarrow a \quad \frac{1}{2}[n_o(\omega) + n_a(\omega)] &= n_a(2\omega) \end{aligned}$$

Dabei steht „o“ und „a“ für ordentlicher bzw. außerordentlicher Strahl.

Kritische Phasenanzapfung. Es fällt auf, dass die k -Vektoren aufgrund der Doppelbrechung einen Winkel ρ einschließen, der auch als „walk-off“ bezeichnet wird. Das bedeutet aber ein Auseinanderfließen von Grund- und Oberwelle, sodass der Bereich im Kristall, in dem Konversion möglich ist, stark eingeschränkt wird. Für Typ-I-Phasenanzapfung ist ρ gegeben durch

$$\tan \rho = \frac{(n_o(\omega_1))^2}{2} \left(\frac{1}{(n_e(\omega_2))^2} - \frac{1}{(n_o(\omega_2))^2} \right) \sin(2\Theta). \quad (14.10)$$

Je größer ρ ist, desto geringer ist der Konversionsbereich und damit verbunden auch die Effizienz der Frequenzumwandlung.

Aufgrund der Strahldivergenz entsteht ein zusätzlicher Verlust bei der Konversionsrate. Schon kleinste Abweichungen $\delta\Theta$ vom Phasenanzapfungswinkel Θ schlagen sich deutlich in der Konversionsrate nieder. Rechnungen zeigen, dass z.B. bei Frequenzverdopplung ein linearer Zusammenhang zwischen $\delta\Theta$ und Δk besteht. Eine Phasenanzapfung unter diesen schwierigen Bedingungen bezeichnet man deshalb auch als *kritische* Phasenanzapfung.

Nichtkritische Phasenanzapfung. Bei Θ -Werten von 0° bzw. 90° verschwindet ρ , d.h. der kohärente Überlapp der beiden Wellen ist über die ganze Kristalllänge hin gegeben. Bei einigen Kristallen ist es in der Tat möglich, einen Phasenanzapfungswinkel von 90° zu erzielen (s. Abb. 14.26).

Theoretische Betrachtungen ergeben, dass in diesem Fall eine sehr viel kleinere quadratische Abhängigkeit zwischen $\delta\Theta$ und Δk besteht. Allerdings gilt hier die Gleichheit der Brechungsindizes nur für eine ganz bestimmte

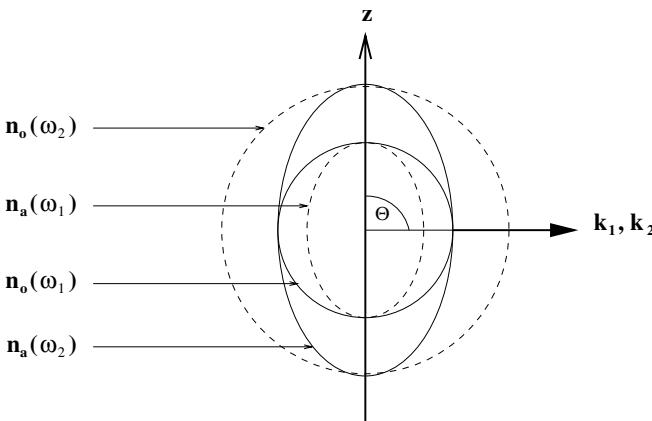


Abb. 14.26. Brechungsindexellipsoid für $\Theta = 90^\circ$ -Anpassung

Wellenlänge. Da jedoch die Brechungszahlen neben der Frequenzabhängigkeit auch eine Temperaturabhängigkeit der Form

$$\frac{d(n_{\omega_1}^o - n_{\omega_2}^e)}{dT} \neq 0 \quad (14.11)$$

aufweisen, ist eine leichte Verschiebung im Wellenlängenbereich möglich. Wegen der unempfindlicheren Erzeugung der Frequenzvervielfachung bezeichnet man diese Art der Phasenanpassung auch als *nichtkritische* Phasenanpassung.

Nachteile dieser Methode liegen zum einen in dem durch die Wellenlänge begrenzten Einsatzbereich, zum anderen muss der Kristall mit einer äußerst konstanten Temperatur homogen geheizt werden, was große technische Probleme mit sich bringt.

Experimenteller Aufbau. In Abb. 14.27 ist die experimentelle Realisierung der Frequenzvervielfachung am Pikosekundenlasersystem dargestellt.

Die Fundamentalwellenlänge des Lasers trifft über einen Umlenkspiegel auf eine plankonvex Linse mit einer Brennweite von 500 mm. Dadurch wird der Laserstrahl von anfänglich ca. 2,5 mm Durchmesser auf etwa 250 μm im Fokalsbereich eingeschnürt. Die Fokussierung hat den Zweck, die Leistungsdichte, die ja bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Effizienz der Umwandlung hat, zu erhöhen. Im Bereich des Fokus befinden sich drei BBO-Kristalle zur Frequenzvervielfachung. Am Ausgang des dritten Kristalls erhält man schließlich eine Überlagerung aller erzeugten Wellenlängen. Die Materialparameter für BB-Kristalle sind in Tabelle 14.11 zusammengestellt.

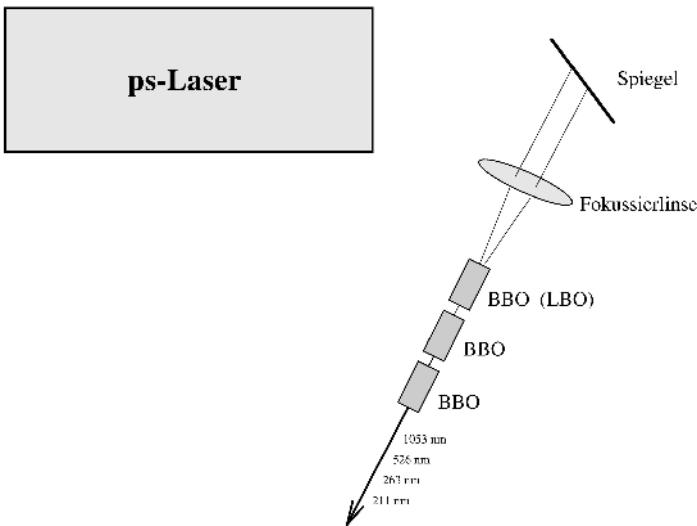


Abb. 14.27. Aufbau zur Frequenzvervielfachung des ps-Lasers (Erzeugung der 1., 2., 4. und 5. Harmonischen)

Tabelle 14.11. Materialparameter für BBO ($\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$)

	2ω	4ω	5ω
Phasenanpassungswinkel Θ [°]	22.9	47.5	51.1
walk-off ρ [°]	3.19	4.77	5.34
Brechungsindex (nach Sellmeier-Gleichung)			
$n_o(\omega)$	1.68	1.76	1.85
$n_a(\omega)$	1.56	1.62	1.68
Temperatursensitivität $\partial(\Delta k)/\partial T$ [cm $^{-1}$ /°C]	0.14	1.03	2.5
Winkelsensitivität $\partial(\Delta k)/\partial\Theta$ [cm $^{-1}$ /mrad]	10.7	34	50
nichtlinearer Koeffizient d_{eff} [10 12 m/V]	1.69	1.29	1.21
Transparenz [μm]	0.18–3.5		
Absorption [cm $^{-1}$]	0.005		
Zerstörschwelle [GW/cm 2]	13.0		

14.4.2 Ti:Saphir-Femtosekundenlaser²

In Abb. 14.28 ist die Prinzipskizze eines Z-gefalteten Ti:Saphir-Femtosekundenlasers dargestellt. M_1 und M_2 sind plane Endspiegel, M_2 und M_3 besitzen je nach Erfordernissen einen Krümmungsradius zwischen 100 und 250 mm. Der Laserkristall mit einer Länge von etwa 10 mm liegt im Fokus der Hohlspiegel und ist unter dem Brewster-Winkel geschnitten. Dadurch ergibt sich

² Der Abschnitt über Femtosekundenlaser und KLM wurde auszugsweise aus den Diplomarbeiten von Peter Brockhaus und Michael Tewes entnommen

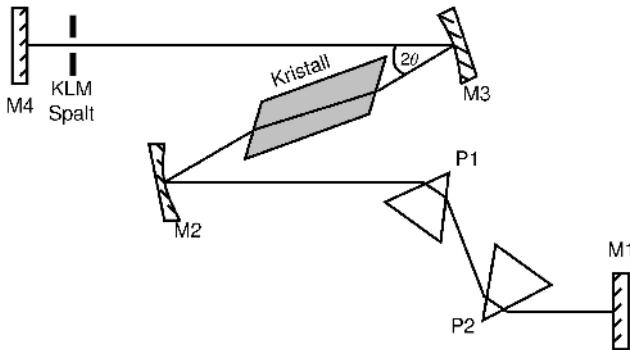


Abb. 14.28. Prinzipieller Aufbau eines Ti:Saphir-Femtosekundenlasers mit Z gefaltetem Resonator

die Notwendigkeit einer Astigmatismuskorrektur. Das Prismenpaar P_1, P_2 ist zur Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) erforderlich.

GVD-Kompensation. In jedem Medium tritt Gruppengeschwindigkeitsdispersion auf: Durch den wellenlängenabhängigen Brechungsindex ergeben sich unterschiedliche Geschwindigkeiten für kurz- bzw. langwellige Strahlung. Da die kurzen Wellenzüge der Femtosekundenpulse nicht mehr als monochromatisch angesehen werden können, wird der Ausgleich der Dispersionseffekte wesentlich für den Aufbau eines Lasersystems.

Im für Ultrakurzoszillationen wichtigen Bereich zwischen 700 und 900 nm ist die GVD für die üblichen optischen Materialien positiv. Dadurch laufen die niederfrequenten den hochfrequenten Anteilen voraus. Um eine effektive Modenkopplung zu ermöglichen, werden zur Korrektur der GVD Prismenstrecken eingesetzt (Abb. 14.29).

Da außerdem für den Kerr-Lens-Prozess eine *negative* GVD erforderlich ist, kann auch diese mit geeigneter Dimensionierung der Prismenstrecke verwirklicht werden.

Der erforderliche Prismenabstand lässt sich mit den folgenden Formeln ermitteln:

- Materialdispersion:

$$\frac{d^2\Phi}{d\omega^2} = \frac{\lambda^3 l}{2\pi c^2 d} \frac{d^2 n}{d\lambda^2}. \quad (14.12)$$

- Unterschiede im optischen Weg P in der Prismenstrecke in Abhängigkeit von der Wellenlänge:

$$\frac{d^2 P}{d\lambda} = 4 \left[\frac{d^2}{d\lambda^2} + (2n - n^{-3}) \left(\frac{d}{d\lambda} \right)^2 \right] l \sin \beta - 8 \left(\frac{d}{d\lambda} \right)^2 l \cos \beta. \quad (14.13)$$

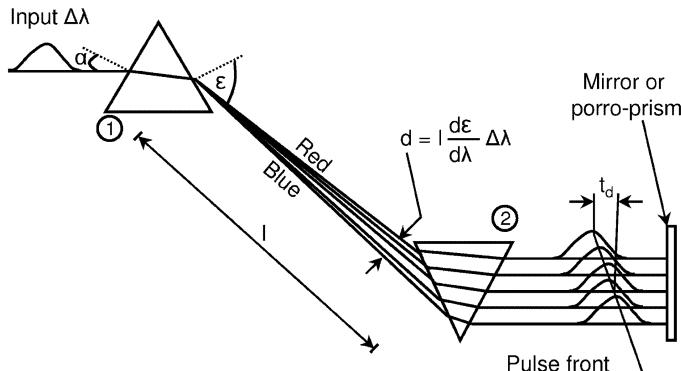


Abb. 14.29. Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) durch Prismen

Voraussetzung ist ein Lichtstrahl, der das 1. Prisma an der Spitze passiert und in ein Lichtbündel zerlegt wird.

Der langwellige Anteil des Strahlenbündels soll dann bei dem 2. Prisma wieder auf die Spitze auftreffen. β ist der Winkel zwischen den Prismenspitzen und dem Auftreffpunkt des kurzwelligen Anteils des Lichtbündels auf dem 2. Prisma, also ein Maß für die unterschiedliche Brechung verschiedener Wellenlängen. Da dieser klein ist, gilt $\sin \beta \ll \cos \beta$. Damit kann als Näherung $l \sin \beta$ gleich der doppelten Spotsize und $\cos \beta = 1$ gesetzt werden. In der Praxis wird $l \sin \beta$ etwas größer gewählt, damit die Lichtbündel bei der Justierung des Lasers nicht über die Prismenränder heraustreten.

Die Faltungswinkel Θ im Z-Resonator ergeben sich durch die Astigmatismuskompensation. Fokussiert man schräg durch eine Grenzfläche mit einem Brechungsindexunterschied, so ergibt sich kein normaler Fokus mehr, sondern zwei Brennlinien. Diesen Effekt bezeichnet man als Astigmatismus. Glücklicherweise zeigen auch Hohlspiegel einen Astigmatismus, wenn der Strahl nicht senkrecht einfällt. Das kann man sich zunutze machen, um durch eine geeignete Anordnung den Astigmatismus der Brewster-Enden zu kompensieren.

Der Ti:Saphir-Laserkristall. Die zur Zeit am häufigsten für durchstimmbare Laser eingesetzte Materialien sind titandotierte Kristalle. Die extrem breite Durchstimmbarkeit über fast eine Oktave des optischen Spektrums wurde 1982 entdeckt (Abb. 14.30).

Ti:Saphir vereint einen breiten Abstimmungsbereich von etwa 400 nm mit einem relativ großen Wirkungsquerschnitt. In diesem Material wird ein geringer Prozentsatz der Al^{3+} -Ionen aus dem Al_2O_3 durch Ti^{3+} -Ionen ersetzt. Die kommerziell erhältlichen Kristalle sind mit 0,06–0,15 Gewichtsprozent Titan dotiert. Ti:Saphir-Kristalle haben ein breites Absorptionsband im blau-grünen Spektralbereich mit einem Maximum bei 490 nm. Ein relativ schwä-

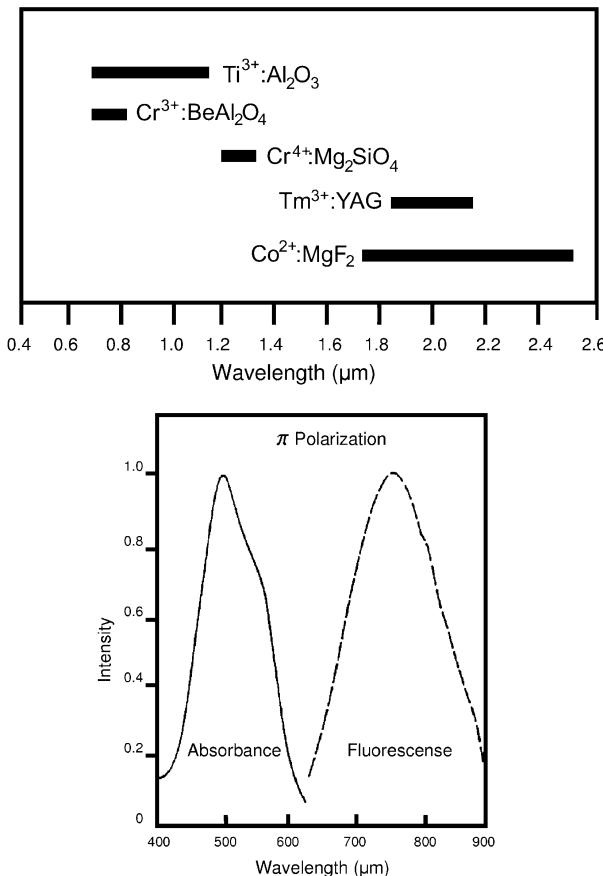


Abb. 14.30. Oben: Durchstimmbarkeit verschiedener kommerziell verfügbarer Laser, darunter auch Titan:Saphir. Unten: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Ti^{3+} Ionen in Saphir

ches Absorptionsband wird im Infraroten beobachtet. Es wird durch Ti^{3+} - und Ti^{4+} -Paare hervorgerufen. Diese IR-Absorption beeinträchtigt die Laseraktivität, die im selben Spektralbereich stattfindet. Optimierte Kristallzüchtungsmethoden und Ausglühtechniken haben die Auswirkungen dieses Absorptionsbandes jedoch minimieren können. Die Qualität des Kristalls hinsichtlich dieser parasitären Absorptionen wird durch die FOM-Zahl (Figure Of Merit) angegeben. Sie charakterisiert das Verhältnis zwischen der maximalen Absorption bei 490 nm und der unerwünschten bei 800 nm. Materialien mit $\text{FOM} > 100$ sind heute standardmäßig verfügbar.

Das große Interesse an Ti:Saphir ist in seinem extrem breiten Fluoreszenzband begründet, welches eine durchstimmmbare Laseremission im Bereich von

Tabelle 14.12. Daten des Titan:Saphir-Kristalls

Brechungsindex	$n = 1,76$
Fluoreszenzlebensdauer	$\tau = 3,2 : \mu\text{s}$
Fluoreszenzbreite(FWHM)	$\Delta\lambda \sim 180: \text{nm}$
Wellenlänge maximaler Emission	$\lambda_p \sim 790: \text{nm}$
Wirkungsquerschnitt parallel zur c -Achse	$\sigma_p \sim 4,1 \times 10^{-19} \text{ cm}^2$
senkrecht zur c -Achse	$\sigma_s \sim 2,0 \times 10^{-19} \text{ cm}^2$
Quanteneffizienz für 530 nm Pumpphoton	$\eta_Q \sim 1$

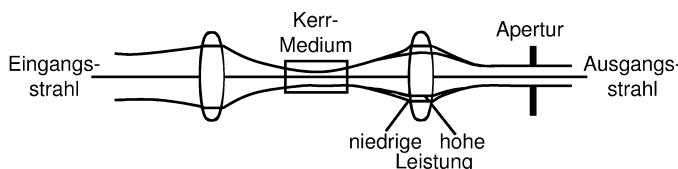
600–1070 nm ermöglicht. Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei etwa 800 nm. Typische Daten sind in Tabelle 14.12 zusammengestellt [4].

Kerr-Lens-Modenkopplung. Als einfaches Modell der Kerr-Lens-Modenkopplung kann man ein System mit drei Komponenten n ansetzen:

- Eine disulative Verzögerung, die meist durch Prismenstrecken erreicht wird;
- eine Amplitudenmodulation,
- die Kerr-Nichtlinearität.

Im Ti:Saphir-Festkörperlaser führt das Kerr-Lens-Modelocking zur Amplitudenmodulation. Grundlage hierfür ist der intensitätsabhängige Brechungsindex, der eine Selbstfokussierung im Kerr-Medium verursacht. Dies lässt sich auf zwei Arten ausnutzen: Einerseits lässt sich die leistungsbezogene Änderung im Strahlprofil durch eine Blende in eine passive Amplitudenmodulation umsetzen. Abbildung 14.31 erläutert diesen Vorgang. Andererseits wird durch die Selbstfokussierung im Gain-Medium eine bessere Ausnutzung der Pumpleistung ermöglicht (Abb. 14.32): Der mittels eines zweiten Lasers gepumpte Bereich zwischen $-0,008$ und $+0,008$ mm hat mit dem gestrichelt dargestellten KLM-Mode einer größeren Überlapp als mit dem gepunktet gezeichneten CW-Mode. Also wird der KLM-Mode eine höhere Verstärkung erfahren. Dieser Vorgang wird als *Gain-Guiding* bezeichnet.

Beide Effekte führen zusammen zu einer Selektion: der KLM-Mode wird durch die geringeren Verluste und die höhere Verstärkung ausgewählt. Dieser Einschwingvorgang dauert je nach Konfiguration zwischen 500 und 2000 Umläufe und ist statistischen Schwankungen unterworfen.

**Abb. 14.31.** Wirkungsweise einer Blende im Resonator

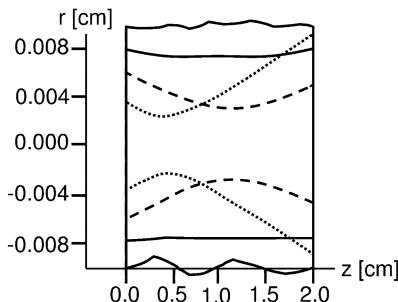


Abb. 14.32. Gain-Guiding im Kristall

14.5 Freie-Elektronen-Laser

14.5.1 Physikalisches Prinzip der Freie-Elektronen-Laser

Eine eigene Klasse kohärenter Lichtquellen sind die Freie-Elektronen-Laser (FEL). Das „Medium“ des FEL ist ein Strahl relativistischer Elektronen eines Beschleunigers, der ein transversales, periodisches Magnetfeld eines sog. Undulators durchläuft (Abb. 14.33). Durch die beschleunigte Bewegung der Elektronen werden Photonen emittiert. Eine Resonanzbedingung, die die Elektronenenergie $E_0 = \gamma \cdot m_0 c^2$, die Stärke des Magnetfeldes B_0 und dessen

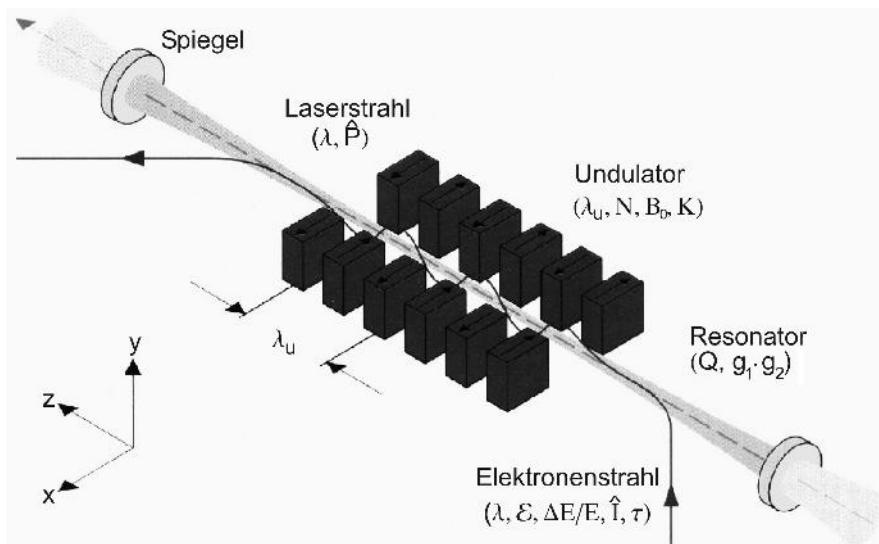


Abb. 14.33. Prinzip eines FEL

Periodizität λ_u enthält, definiert die Wellenlänge der emittierten Strahlung:

$$\lambda = \frac{\lambda_u}{2\gamma^2} \left(1 + \frac{K^2}{2} \right). \quad (14.14)$$

Dabei ist der Undulatorparameter $K \sim \lambda_u \cdot B_0$. Das Spektrum der spontan emittierten Strahlung wird mit der Anzahl N der Undulatorperioden um $1/N$ eingeengt. Durch einen Resonator kann das emittierte Licht wieder in den Undulator zurückgekoppelt werden. Das „Lasen“ des Lichtfeldes folgt allerdings noch nicht aus der eben zitierten Resonanzbedingung, sondern es muss die sehr komplizierte Beschreibung des statischen Magnetfeldes sowie das Feld der stehenden Welle im Resonator in Wechselwirkung mit den relativistischen Elektronenpaketen berücksichtigt werden.

Die herausragende Eigenschaft von FEL ist die Möglichkeit der kontinuierlichen Durchstimmung von λ durch Variation von λ_u und der Elektronenenergie γ . So decken die bis 1997 realisierten 31 FEL einen Wellenlängenbereich von 230 nm bis 10 mm ab.

Zudem können FEL auch mit extrem hohen Leistungsdichten im Resonator betrieben werden, da kein solides Medium mit einer unvermeidlichen Zerstörschwelle vorliegt. Weitergehende Informationen zu FEL finden sich in der umfangreichen Literatur, z.B. in [3, 5].

14.5.2 Die Freie-Elektronen-Laser FELIX und S-DALINAC

Im Folgenden werden die FEL FELIX in Nieuwegen/Niederlande sowie S-DALINAC in Darmstadt, der als erster deutscher FEL 1996 angeschwungen ist, beispielhaft vorgestellt [11]. Die beiden FEL können im Bereich von 6–7 μm operieren, unterscheiden sich aber stark in der Pulsstruktur (Tabelle 14.13).

Der 1991 fertiggestellte Beschleuniger für den S-DALINAC wird hauptsächlich für kernphysikalische Forschung eingesetzt. Der Elektronenstrahl des S-DALINAC kann kontinuierlich mit der Beschleunigungs frequenz von 3 GHz betrieben werden, sodass als Konsequenz auch ein cw-Photonenstrahl mit Piko sekundensubstruktur erzeugt werden kann (Abb. 14.34).

Tabelle 14.13. Vergleich der FEL-Parameter

	FELIX	DALINAC
λ	6,4–6,7 μm	7 μm
τ_{Mak}	10 μs	1–8 ms
τ_{Mik}	ps	ps
f_{rep}	8 Hz	31 Hz

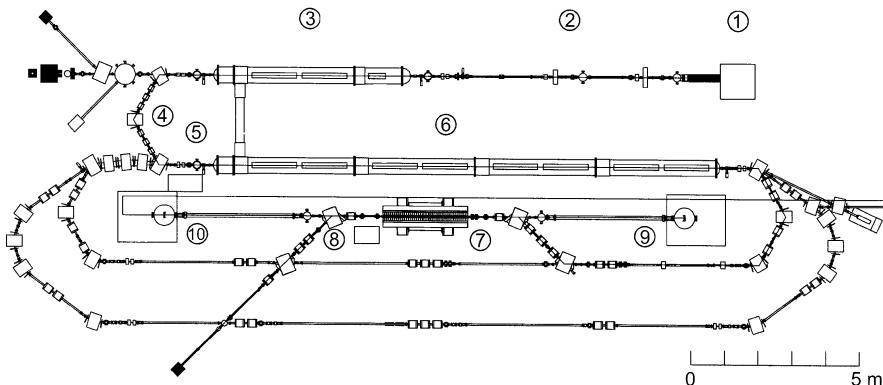


Abb. 14.34. Aufbau des FEL am S-DALINAC. Der Elektronenstrahl wird von der Glühkathode (1) aus in den 10-MeV-Injektor-Linac (3) gespeist, wobei im Abschnitt (2) die 3-GHz-Zeitstruktur aufgeprägt wird. Im supraleitenden Beschleuniger (6) können die Elektronen pro Durchlauf bis zu 40 MeV gewinnen. Der Elektronenstrahl kann durch die Transportsysteme im unteren Teil ein oder zweimal rezirkuliert werden, sodass Energien von 130 MeV erreicht werden können. Wenn der Elektronenstrahl in den Undulator (7) eingekoppelt wird, kann die emittierte Strahlung vom Spiegel (10) wieder auf den 2. Resonatorspiegel (9) reflektiert werden. Am Auskoppelpiegel (10) ist ein 60 m langes Auskoppelsystem, das in das optische Labor führt, angebracht

Der Beschleuniger für FELIX hingegen ist speziell für den Betrieb des FEL konzipiert worden. In zwei Beamlines deckt FELIX den Bereich von 5–130 μm ab. Der Beschleuniger liefert hier 10 μs lange Pulssüge, die die Einhüllende der ps-Substruktur sind [9].

14.5.3 Medizinische Forschung mit FEL

Für die grundlegende Untersuchung der Wechselwirkung von Licht mit Gewebe sind FEL sehr wertvolle Instrumente, da sehr leicht Wellenlängenbereiche untersucht werden können, die bisher noch nicht von anderen Lasern abgedeckt werden. Zudem haben viele FEL ausreichend hohe Ausgangsleistungen und eignen sich deshalb für laserchirurgische Untersuchungen.

Wegen der starken Absorption von Wasser ist der Spektralbereich ab etwa 2 μm für chirurgische Laser zum Schneiden und Ablatieren interessant [12]. Hier konnten sich schon einige weiter oben erwähnte Systeme in der Praxis etablieren (z.B. Er:YAG (3 μm), Ho:YAG (2,1 μm) und CO₂ (um 10 μm) [1]). Wegen eines Absorptionspeaks von Wasser und Proteinstrukturen um 6,4 μm scheint auch dieser Bereich recht vielversprechend zu sein [10, 11]. Mit FEL können interessante Wellenlängenbereiche untersucht werden, um optimale Parameter für spezielle Einsatzgebiete zu finden. Neben der Laserwellenlänge ist natürlich auch die Pulssstruktur des Lasers für den Abtragungsprozess ausschlaggebend.

Literatur

1. Berlin HP, Müller GJ (1988) Angewandte Lasermedizin. ecomed, München/Laser-Medizin-Zentrum Berlin, pp. 1988–1993
2. Bloembergen N (1965) Nonlinear Optics. Benjamin, New York
3. Brau CA (1991) Free electron lasers. Academic Press, Boston
4. Brockhaus P (1994) Aufbau eines PLC-stabilisierten 75 fs-Cr:LiSAF- und Verbesserung eines Ti:Saphir-Pulslasers mit Hilfe numerischer Simulation. Diplomarbeit, Universität Heidelberg
5. Deacon DAG, Elias LR, Maday JM-J, Ramian GJ, Schwettman HA, Smith TI (1977) First operation of a free-electron laser. *Phys Rev Lett* 38:892–894
6. Edwards G, Logan R, Copeland M, Reinisch L, Davidson J, Johnson B, Maciunas R, Mendenhall M, Ossof R, Tribble J, Werkhoven J, O'Day D (1994) Tissue ablation by a free electron laser tuned to the amide II band. *Nature* 371:416–619
7. Kessler R (1997) Frequenzvervielfachung eines ps-Lasersystems zur Ablation von Cornea-Gewebe. Diplomarbeit, Universität Heidelberg
8. Kneubühl FK, Sigrist MW (1986) Laser. Teubner, Stuttgart
9. Knippels G (1996) The short-pulse free-electron-laser: manipulation of the gain medium. Academisch proefschrift, Vrije Universiteit Amsterdam
10. Ostertag M, Walker R, Bende T., Jean BJ (1995) Optimizing photoablation parameters with FEL technology in the mid IR: a predictive model for the description of experimental data. *SPIE* 2391:138–149
11. Richter A (1998) Der neue Freie-Elektronen-Laser in Darmstadt. *Physikalische Blätter* 54-1:31–36
12. Walker R (1995) Photoablation with the FEL in the far IR (50 μm) in biological soft tissue (cornea). *Proc SPIE*: 2391

15 Laser-Gewebe-Wechselwirkungen

J. Bille

15.1 Überblick über die Arten der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen

15.1.1 Klassifizierung nach Wechselwirkungszeiten

Bei der Wechselwirkung zwischen Laserlicht und Gewebe treten je nach Intensität und Wellenlänge der Strahlung verschiedene Prozesse auf, die sich anschaulich nach Laserpulsdauern klassifizieren lassen (Abb. 15.1) [9].

Die Wechselwirkungsprozesse können zur groben Klassifizierung in vier Kategorien unterteilt werden [2]: photochemisch, photothermisch, photoablativ und photodisruptiv/plasmainduziert. Es zeigt sich, dass die Wechselwirkungsdauer – bestimmt durch die Pulsdauer – einen für die Unterteilung

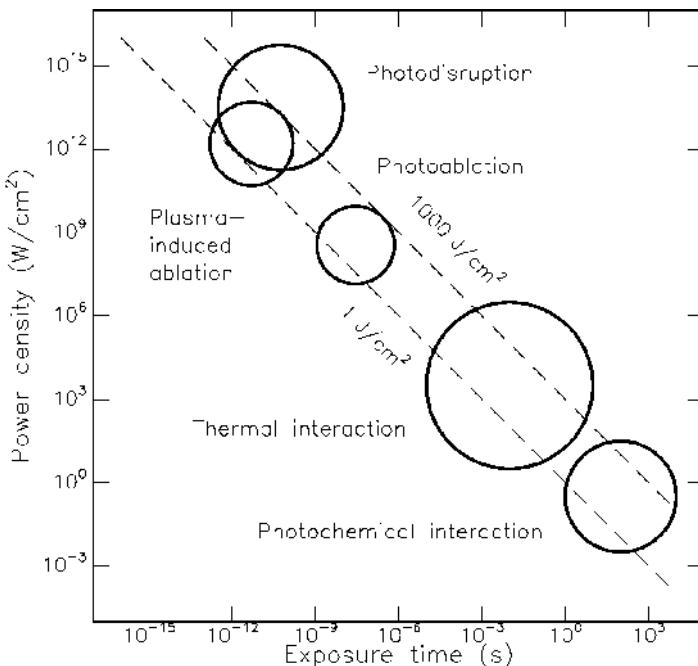


Abb. 15.1. Klassifizierung der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen nach Pulsdauer und Intensität. Aus [9]

weitgehend charakteristischen Parameter darstellt. Sie variiert von mehreren Minuten bei der photochemischen Wechselwirkung bis hin in den Piko- oder sogar Femtosekundenbereich bei der plasmainduzierten Ablation. Je kürzer die Wechselwirkungsdauer, desto höhere Leistungsdichten werden für die Laserbehandlung benötigt, sodass die therapeutisch sinnvollen Energiedichten für alle Prozesse im Bereich von $1\text{--}1000\text{ J/cm}^2$ liegen.

15.1.2 Beispiele für die klinische Lasertherapien

In Tabelle 15.1 werden zu jedem Wechselwirkungsmechanismus exemplarisch einige klinische und vorklinische Lasertherapien sowie die zur Zeit wichtigsten medizinischen Laser aufgeführt.

Tabelle 15.1. Beispiele für Lasertherapien

Wechselwirkung	Wechselwirkungs- dauer τ , Pulsdauer	typische Laser	Anwendungsgebiete
photochemisch	cw:sec	Farbstofflaser Ti:SA	PDT von Tumoren (z.B. Lunge, Ösophagus, Haut, Blase usw.)
thermisch: Koagulation ($T > 60^\circ\text{C}$)	ms	Nd:YAG	Hämostase, Koagulation von Tumoren (LITT, z.B. Neurochirurgie)
Vaporisation ($T > 100^\circ\text{C}$)	cw:ms–sec	Ar, Kr-Ionen CO ₂ -Laser	Koagulation der Retina Resektion von Tumoren (Neurochirurgie, Gynäkologie)
Ablation (thermo- mechanisch)	μs –ms	Er:YAG, Ho:YAG, Er:YSGG, o.ä.	Abtragung von Knochen und Weichteilgewebe*, z.B. Stapedotomie (HNO)
photoablativ	ns	Excimerlaser (z.B. ArF, XeCl))	Angioplastie*, refraktive Hornhautchirurgie*
	ps	4./5. Harmonische Nd:YAG, Nd:YLF	
photodisruptiv/ plasmainduziert	ns, ps, fs	Nd:YAG, Nd:YLF, Ti:Sa (Farbstofflaser)	Kapsulotomie, Iridotomie, intrastomale Ablation* (Ophthalmologie), Resektion von Tumoren* (Neurochirurgie [1]), Fragmentation von Gallen- und Nierensteinen (Lithotripsie)*

* In Erprobung

15.2 Photochemische Wechselwirkung

15.2.1 Grundlagen der photochemischen Wechselwirkung

Die photochemische Wechselwirkung ist Grundlage der in den letzten Jahren immer erfolgreicher eingesetzten photodynamischen Therapie (PDT). Dabei werden dem Patienten sog. *Photosensitizer* (S), d.h. Farbstoffe, die sich selektiv im Tumorgewebe anreichern, intravenös gespritzt. Mögliche Reaktionskinetiken eines *Photosensitizers* sind in Tabelle 15.2 aufgeführt.

Durch die anschließende Bestrahlung des Tumorgewebes erfolgt eine elektronische Anregung der Farbstoffe ($^1S^*$), die i. Allg. eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen. Strahlungslose Übergänge (*intersystem-crossing*) führen zu einer Besetzung langlebiger Triplettzustände ($^3S^*$). Diese können über unterschiedliche Transfermechanismen zur Besetzung von angeregten Singulettzuständen von benachbarten Sauerstoffmolekülen führen, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität eine starke zytotoxische Wirkung besitzen [5,15]. Der bekannteste in der PDT benutzte Sensitizer ist das Hämatorphyrinderivat (HpD); es werden zur Zeit aber eine Vielzahl von neuen Farbstoffen auf der Basis von Porphyrin, Chlorin, Phthalocyanin und anderen Substanzen hinsichtlich ihrer selektiven Anreicherungsrate und ihrer photochemischen Effizienz untersucht. Die Wahl der Wellenlänge ist natürlich

Tabelle 15.2. Kinetik der Photosensibilisation (S: photosensitizer, RH: Substrat mit Wasserstoffbindung, CAR: Carotenoid). Aus [9] nach [2]

Excitation

- Singlet state absorption $^1S + h\nu \implies ^1S^*$

Decays

- Radiative singlet decay $^1S^* \implies ^1S + h\nu'$ (*fluorescence*)
- Nonradiative singlet decay $^1S^* \implies ^1S$
- Intersystem crossing $^1S^* \implies ^3S^*$
- Radiative triplet decay $^3S^* \implies ^1S + h\nu''$ (*phosphorescence*)
- Nonradiative triplet decay $^3S^* \implies ^1S$

Type I reactions

- Hydrogen transfer $^3S^* + RH \implies SH^\bullet + R^\bullet$
- Electron transfer $^3S^* + RH \implies S^{\bullet-} + RH^{\bullet+}$
- Formation of hydrogen dioxide $SH^\bullet + ^3O_2 \implies ^1S + HO_2^\bullet$
- Formation of superoxide anion $S^{\bullet-} + ^3O_2 \implies ^1S + O_2^\bullet$

Type II reactions

- Intramolecular exchange $^3S^* + ^3O_2 \implies ^1S + ^1O_2^*$
- Cellular oxidation $^1O_2^* + Cell \implies Cell_{ox}$

Carotenoid protection

- Singlet oxygen extinction $^1O_2^* + ^1CAR \implies ^3O_2 + ^3CAR^*$
- Deactivation $^3CAR^* \implies ^1CAR + heat$

abhängig von der Lage des Absorptionsbandes des jeweiligen Sensitzers. Da aber gleichzeitig eine ausreichende Eindringtiefe in das Gewebe gewährleistet sein muss, kommen in der Praxis nur Wellenlängen im „optischen Fenster“ zwischen 500 nm und 800 nm in Frage.

15.2.2 Prinzip der photodynamischen Therapie

In Abb. 15.2 ist der Ablauf der Photodynamischen Therapie schematisch wiedergegeben.

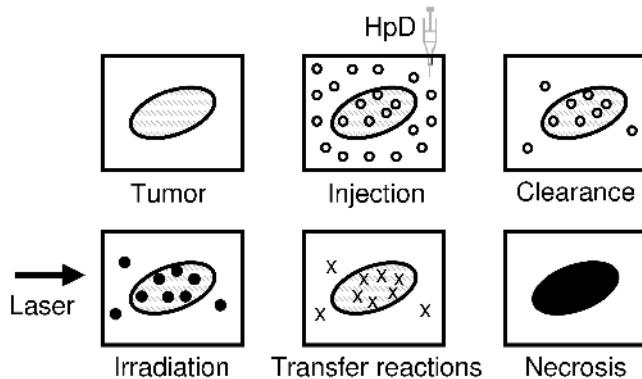


Abb. 15.2. Schema der Photodynamischen Therapie (PDT). Aus Niemz [9]

15.3 Photothermische Wechselwirkung

15.3.1 Grundlagen der photothermischen Wechselwirkung

Die photothermische Wechselwirkung kann man als einen 2-Stufen-Prozess auffassen. Durch Absorption eines Photons der Energie $h\nu$ wird ein Molekül des Gewebes in einen angeregten Zustand befördert. Inelastische Stöße führen zu einer Abregung bei gleichzeitiger Energieabgabe auf andere Moleküle in Form kinetischer Energie, also:

- Absorption: $A + h\nu \rightarrow A^*$
- Abregung: $A^* + M(E_{\text{kin}}) \rightarrow A + M(E_{\text{kin}} + \Delta E_{\text{kin}})$.

Diese Zunahme von kinetischer Energie im Gewebe führt zur Aufheizung. Je nach Dauer der Bestrahlung, d.h. der Stärke des Aufheizens, unterscheidet man vier verschiedene Effekte (Tabelle 15.3):

Bis zu einer Temperatur von $\approx 40^\circ\text{C}$ bleibt das Gewebe ungeschädigt. Ab ca. 45°C kommt es zu Veränderungen in den Zellmembranen, die zum Zelltod führen können (Hyperthermie). Bei ca. 60°C erfolgt die Denaturierung

Tabelle 15.3. Thermische Wechselwirkungen

Temperatur (°C)	biologischer Effekt
45	Hyperthermie
60	Koagulation, Proteindenaturierung
100	Vaporisation
≥ 100	Karbonisation, Schmelzen

(irreversible Strukturänderung) der Proteine. Zudem wird das Gewebe koaguliert. Ab einer Temperatur von 100°C setzt die Verdampfung von Wasser innerhalb des Gewebes ein. Dies führt zu einer Drucksteigerung im Gewebe, die schließlich Mikroexplosionen und damit eine Abtragung des Gewebes zur Folge hat. Bei Temperaturen $\geq 100^{\circ}\text{C}$ verkohlt das Gewebe (Karbonisation) [9].

Wichtig für die Abschätzung der Schädigung des umgebenden Gewebes außerhalb des Laserfokus ist die thermische Relaxationszeit [7]. Die thermische Relaxationszeit $\tau = d^2/(4\kappa)$ gibt die Zeit an, in der sich der durch den Laserpuls entstandene Temperaturgradient wieder abbaut. Dabei ist d eine für den anfänglichen Temperaturgradienten charakteristische Diffusionslänge; sie liegt in der Größenordnung der Eindringtiefe der Laserstrahlung $d \approx \mu_{\text{eff}}^{-1}$. Die thermische Diffusivität hat für Wasser den Wert $\kappa = 1.46 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$. Diese thermische Relaxationszeit muss mit der Pulsdauer t_0 verglichen werden. Für eine cw-Bestrahlung oder große Pulsdauern ($t_0 \gg d^2/4\kappa$) ist die zeitliche Änderung der Temperatur relativ gering, das thermische Gleichgewicht wird durch Wärmediffusion und deponierte Laserleistung bestimmt. Es kann daher zur thermischen Schädigung von angrenzenden, nicht unmittelbar bestrahlten Gewebearealen kommen. Bei sehr kurzen Laserpulsen ($t_0 \ll d^2/4\kappa$) ist die Diffusion dagegen vernachlässigbar, da durch die explosive Vaporisation des direkt bestrahlten Gewebes die deponierte Energie sehr rasch in mechanische Energie (Schockwelle, Kavitationsblase, kinetische Energie der Ablationsfragmente) konvertiert wird. Für die Eindringtiefe von Laserstrahlung in Gewebe ist insbesondere im nahen Infrarot das Absorptionsverhalten des im Gewebe eingelagerten Wassers maßgeblich. In Abb. 15.3 ist die spektrale Absorption von Wasser wiedergegeben.

In der Regel überlagern sich verschiedenartige thermische Effekte in biologischem Gewebe, ausgehend von Karbonisation an der Geweboberfläche bis zu Hyperthermie einige mm im Innern des Gewebes. In den meisten Anwendungsfällen zielt man auf einen spezifischen Effekt ab. Deshalb ist eine sorgfältige Festlegung der zeitlichen und örtlichen Laserparameter erforderlich. Karbonisation, Verdampfung und Koagulation bedeuten irreversible Gewebsveränderungen, während Hyperthermie reversibel oder irreversibel sein kann. Das Zusammenspiel der verschiedenartigen thermischen Effekte ist in Abb. 15.4 dargestellt. Der Entstehungsort und die räumliche Verteilung der

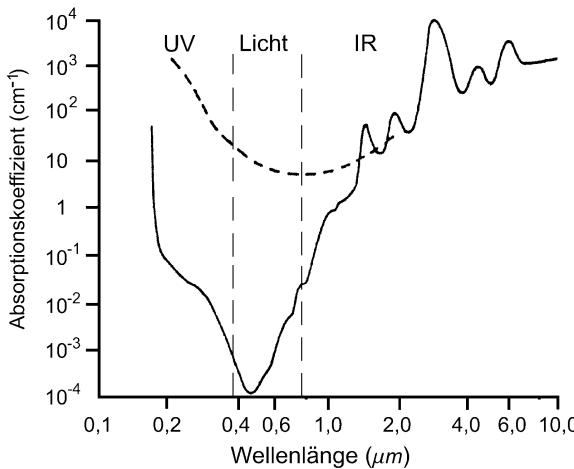


Abb. 15.3. Absorptionskoeffizient (= Reziproke Größe zur Eindringtiefe d) von Strahlung in Wasser. Gestrichelt ist der Absorptionskoeffizient für Gewebe einge tragen. Für Strahlung über $2 \mu\text{m}$ wird die Absorption in Gewebe weitgehend durch die Eigenschaften des Wassers bestimmt

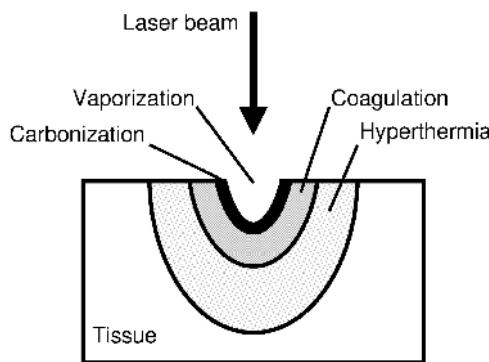


Abb. 15.4. Örtliche Verteilung thermischer Effekte in biologischem Gewebe. Aus [9]

einzelnen thermischen Effekte hängt davon ab, welche Temperatur während und nach der Laserapplikation erzielt wurde.

15.3.2 Modell der photothermischen Wechselwirkung

Es wurden verschiedene Ansätze vorgeschlagen, eine modellmäßige Beschreibung der thermischen Effekte wiederzugeben (Abb. 15.5).

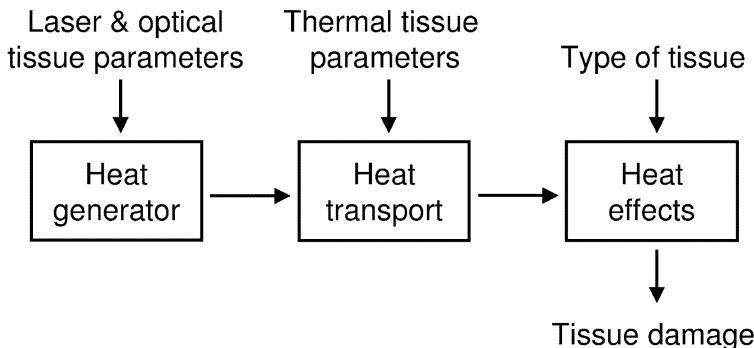


Abb. 15.5. Modell der photothermischen Wechselwirkung. Aus Niemz [9]

Die maßgebliche Beziehung ist die Wärmeleitungsgleichung, die hergeleitet wird von der Kontinuitätsgleichung (j_Q : Wärmestromdichte)

$$\operatorname{div} j_Q = -\dot{Q} \quad (15.1)$$

und der Diffusionsgleichung

$$j_Q = -\lambda \nabla T. \quad (15.2)$$

Man beachte, dass die Größe \dot{Q} in (15.1) die Dimension (J/cm^3) hat, sodass sich der Gesamtfluss berechnet zu

$$\Phi = \oint df j_Q = \int dV \operatorname{div} j_Q = - \int dV \dot{Q}. \quad (15.3)$$

Gleichung (15.2) ist das Analogon zu den elektrodynamischen Gleichungen

$$j = \sigma E, \quad E = -\nabla \phi \quad \rightarrow \quad j = -\sigma \nabla \phi. \quad (15.4)$$

Mit Hilfe der thermodynamischen Beziehung $Q = CT$ (C : Wärmekapazität, c : spezifische Wärmekapazität) erhält man mit (15.1):

$$\dot{T} = \frac{1}{C} \dot{Q} = \frac{1}{\varrho c} \frac{\dot{Q}}{V} = -\frac{1}{\varrho c} \operatorname{div} j_Q. \quad (15.5)$$

Zusammen mit (15.2) ergibt sich

$$\dot{T} = \frac{\lambda}{\varrho c} \Delta T. \quad (15.6)$$

Dies ist die Wärmediffusionsgleichung mit dem Wärmeleitungscoefficienten

$$\kappa = \frac{\lambda}{\varrho c} (\text{cm}^2/\text{sec}). \quad (15.7)$$

Mit einer zusätzlichen Wärmequelle ergibt sich

$$\dot{T} = -\frac{1}{\varrho c}(\operatorname{div} j_Q - S) \quad (15.8a)$$

$$\dot{T} = \frac{\lambda}{\varrho c} \Delta T + \frac{1}{\varrho c} S. \quad (15.8b)$$

Zunächst soll der homogene Teil

$$\dot{T} = \kappa \Delta T \quad (15.9)$$

in der Wärmeleitungsgleichung gelöst werden. In zylindrischen Koordinaten ergibt sich

$$\dot{T} = \kappa \left(\frac{1}{r} \frac{\delta}{\delta r} + r \frac{\delta}{\delta r} + \frac{\delta^2}{\delta z^2} \right) T \quad (15.10a)$$

$$\dot{T} = \kappa \left(\frac{\delta^2}{\delta r^2} + \frac{1}{r} \frac{\delta}{\delta r} + \frac{\delta^2}{\delta z^2} \right) T. \quad (15.10b)$$

Die allgemeine Lösung ist

$$T(r, z, t) = \beta t^{-\frac{3}{2}} \exp \left\{ -\frac{(r^2 + z^2)}{4\kappa t} \right\}. \quad (15.11)$$

Beweis:

$$\dot{T} = -\frac{3}{2t} T + \frac{(r^2 + z^2)}{4\kappa t^2} T \quad (15.12)$$

$$\frac{\delta^2}{\delta r^2} T = \frac{\delta}{\delta r} \left(\frac{-2rT}{4\kappa t} \right) = -\frac{T}{2\kappa} + \frac{4r^2 T}{16\kappa^2 t^2} \quad (15.13)$$

$$\frac{1}{r} \frac{\delta}{\delta r} T = -\frac{2rT}{4\kappa t r} = -\frac{T}{2\kappa t} \quad (15.14)$$

$$\frac{\delta^2}{\delta z^2} T = \frac{\delta}{\delta z} \left(\frac{-2zT}{4\kappa t} \right) = -\frac{T}{2\kappa} + \frac{4z^2 T}{16\kappa^2 t^2}. \quad (15.15)$$

Daraus folgt

$$\begin{aligned} \kappa \Delta T &= -\frac{T}{2t} + \frac{r^2 T}{4\kappa t^2} - \frac{T}{2t} - \frac{T}{2t} + \frac{z^2 T}{4\kappa t^2} \\ &= -\frac{3}{2t} T + \frac{(r^2 + z^2)}{4\kappa t^2} T \\ &= \dot{T}, \quad \text{q.e.d.} \end{aligned} \quad (15.16)$$

Abbildung 15.6 zeigt die numerische Lösung der Wärmediffusion in der Netzhaut. Die Temperatur ist als Funktion von t , r und z dargestellt.

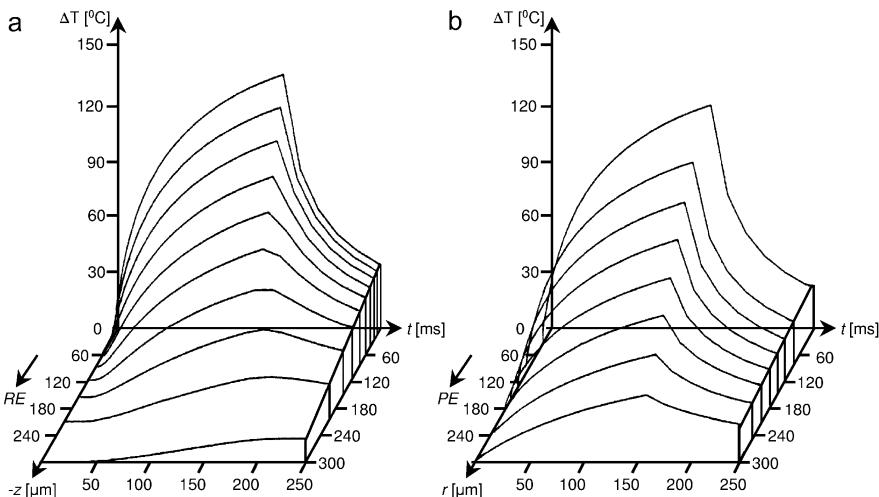


Abb. 15.6. Numerische Analyse der Wärmediffusion in der Netzhaut. Nach [14]

15.4 Photoablative Wechselwirkung

15.4.1 Grundlagen der photoablativen Wechselwirkung

Während bei der thermischen Ablation die Absorption der Laserstrahlung durch Anregung von Vibrations- und Rotationszuständen der Gewebemoleküle erfolgt, kommt es bei der photoablativen Wechselwirkung über elektromagnetische Anregungen von repulsiven Zuständen zum direkten Aufbrechen von molekularen Bindungen. Hierfür sind Photoenergien im Bereich von ca. 5–7 eV, d.h. Wellenlängen < 250 nm erforderlich (Tabelle 15.4). Als Strahlungsquellen in diesem Wellenlängenbereich kommen heute in erster Linie Excimerlaser (z.B. ArF: 193 nm, KrF: 248 nm, XeCl: 308 nm), aber auch höhere Harmonische von Festkörperlasern (z.B. 4. oder 5. Harmonische eines Nd:YAG- oder Nd:YLF-Lasers) in Frage [11] (Tabelle 15.5).

Die Photodissoziation eines Makromoleküls AB (z.B. Kollagen) in seine Fragmente kann folgendermaßen dargestellt werden



Die kinetische Energie der Molekülfragmente ist gleich der Differenz aus Photonenergie und Bindungsenergie: $E_{\text{kin}} = h\nu - E_B$ (Abb. 15.7). Der Wirkungsquerschnitt für die Dissoziation ist abhängig von der Photonenergie und dem Franck-Condon-Faktor, der durch den räumlichen Überlapp der Wellenfunktionen im Grund- und angeregten Zustand gegeben ist. Er beträgt für organische Polymere bei 6 eV ca. 10^{-16} cm^{-2} .

Tabelle 15.4. Dissoziationsenergien einiger chemischer Bindungen. Aus [9]

Chemische Bindung	Dissoziationsenergie (eV)
C=O	7.1
C=C	6.4
O–H	4.8
N–H	4.1
C–O	3.6
C–C	3.6
S–H	3.5
C–N	3.0
C–S	2.7

Tabelle 15.5. Laserquellen für UV-Strahlung. Aus Niemz [9]

Lichtquelle	Wellenlänge (nm)
ArF-Laser	193
KrF-Laser	248
Hg lamp	254
Nd:YLF-Laser (4ω)	263
Nd:YAG-Laser (4ω)	266
XeCL-Laser	308
XeF-Laser	351

Die Thermalisierung der Molekülfragmente und andere Prozesse (z.B. die strahlungslose Rekombination von angeregten gebundenen Molekülzuständen) führen zur lokalen Temperaturerhöhung im Fokus; bei genügend hohen Energiedichten hat der Ablationsprozess daher ähnlich wie im Fall der thermischen Ablation einen explosiven Charakter, der sich z.B. in der Erzeugung von Schockwellen manifestiert. Bei niedrigen Energiedichten hingegen erfolgt die Gewebeabtragung überwiegend durch Oberflächendesorption von abgespaltenen Molekülfragmenten; daher ist auch bei extrem niedrigen Pulsenergien noch eine Abtragung zu beobachten.

Weitgehend umstritten ist jedoch die mutagene und kanzerogene Wirkung der UV-Strahlung. Die meisten biologischen Effekte durch UV-Licht werden durch photochemische Veränderungen der DNA hervorgerufen. Im Wellenlängenbereich von 250–320 nm ist die zytotoxische und mutagene Wirkung der UV-Strahlung daher stark mit dem Absorptionsspektrum der DNA korreliert. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Zytotoxität von Strahlung bei 193 nm (ArF-Laser) geringer als die bei 248 nm (KrF) ist, obwohl die Absorption der DNA in diesem Wellenlängenbereich noch stärker ausgeprägt ist. Ein Grund hierfür ist die effektive Absorption der 193-nm-Strahlung durch Proteine in der Zellmembran und im Zytoplasma, sodass nur ein gerin-

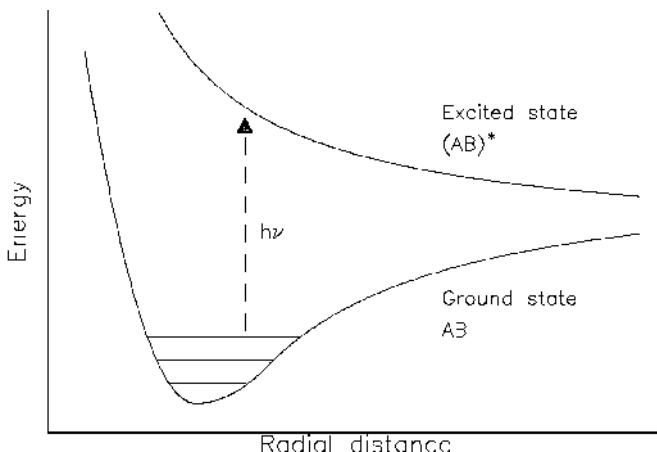


Abb. 15.7. Energieniveauschema der Photoablation. Aus [9]

ger Teil der Strahlung den Zellkern erreicht. Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass die durch 193-nm-Strahlung erzeugten Photoprodukte weniger zytotoxisch reagieren als die durch UV-Licht bei 254 nm produzierten Dimere.

15.4.2 Modell der photoablativen Wechselwirkung

Für Plexiglas (PMMA) wurde die zeitliche Entwicklung des Prozesses der Photoablation von Garrison und Srinivasan (1985) modelliert (Abb. 15.8). Durch Berechnung der dynamischen Ratengleichungen konnte der explosive Charakter der Photoablation nachgebildet werden. Als Anregungslicht wurde ein ArF-Laser mit einer Emission bei 193 nm verwendet. Es wurde auch nachgewiesen, dass die Photoablation ein Schwellwertverhalten aufweist.

In Abb. 15.9 ist die Ablationskurve für Hornhautgewebe des Kaninchens wiedergegeben. Die modellmäßige Vorstellung assoziiert den Schwellwertbereich mit der mittleren Größe der ejizierten Molekülfragmente. Sobald ein entsprechender Anteil dissoziierter Moleküle erreicht ist, werden Molekülfragmente einer bestimmten Größe resorbiert. Oberhalb eines zweiten Schwellwertes, dem Schwellwert für Plasmaerzeugung, ergibt sich eine Sättigung der Ablationstiefe. Dieses Phänomen resultiert aus dem Phänomen der Plasmaschirmung, d.h. nachfolgende Photonen des Anregungspulses führen nur noch zur Aufheizung des Plasmas und damit zu thermischen Nebeneffekten.

Tatsächlich beobachtet man überwiegende Photoablation nur bei der Anregungswellenlänge von 193 nm. Höhere Wellenlängen sind gewöhnlich mit einer wachsenden thermischen Komponente verbunden (Abb. 15.10). Bei allen Wellenlängen ergibt sich ein thermischer Anteil bei kleiner Laserfluenz. Beim ArF-Laser und beim KrF-Laser erhält man einen starken Abfall in der Steigung der Kurven in Abb. 15.10 oberhalb eines Schwellwertes, nämlich der

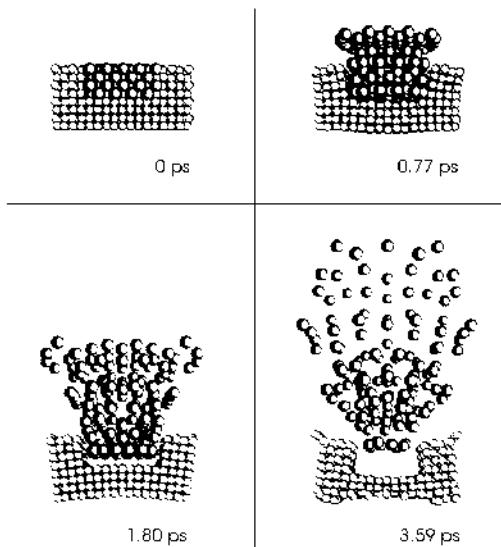


Abb. 15.8. Computersimulation der Photoablation; die Bewegung von PMMA-Monomeren ist als Funktion der Zeit demonstriert. Aus [9] nach [6]

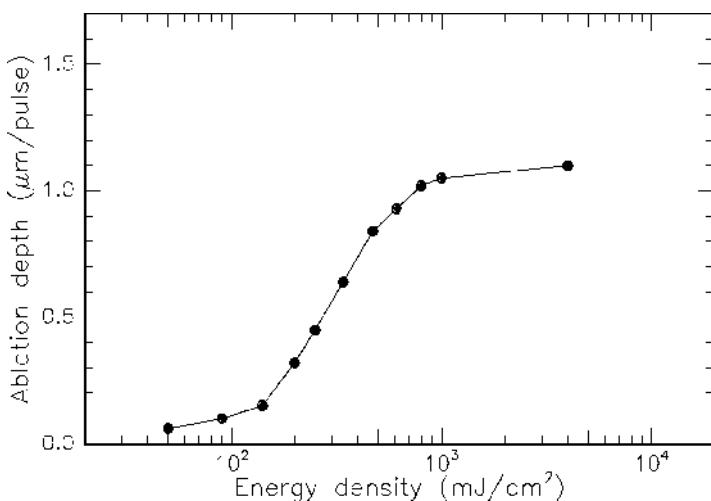


Abb. 15.9. Ablationskurve von Kaninchenhornhaut mit ArF-Excimerlaseranregung. Aus [9] nach [3]

Fluenzschwelle für Photoablation. Die Strahlung des XeCl-Lasers zeigt selbst für höhere Laserfluenzen in der Hauptsache ein thermisches Verhalten.

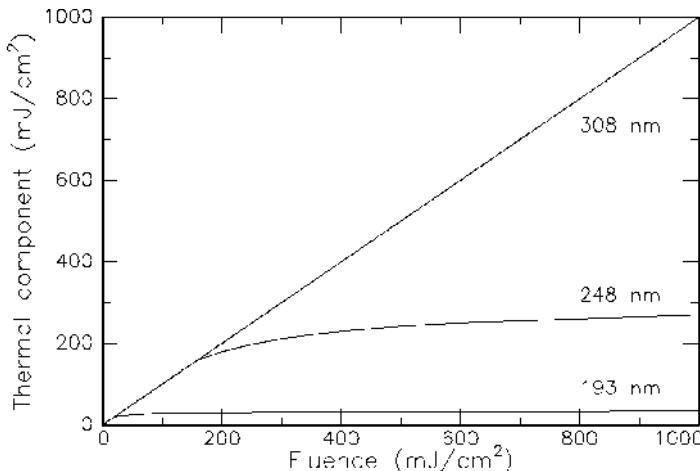


Abb. 15.10. Thermische Komponente der UV-Ablation von PMMA mit drei verschiedenen Excimerlasern (ArF-Laser bei 193 nm, KrF-Laser bei 248 nm und XeCl bei 308 nm). Aus [9] nach [13]

15.5 Photodisruptive/plasmainduzierte Wechselwirkung

15.5.1 Grundlagen der photodisruptiven/plasmainduzierten Wechselwirkung

Übersteigen die Leistungsdichten auf der Gewebeoberfläche Werte um 10^{11} W/cm^2 , wird dort ein Plasma erzeugt. Unter einem Plasma versteht man einen hochionisierten Zustand.

Eine Ionisierung der Atome bzw. Moleküle und damit verbunden die Freisetzung von Elektronen kann auf zweierlei Arten vonstatten gehen: bei Nanosekundenpulsen, wie sie z.B. über eine Güteschaltung realisiert werden können, erhitzt sich das Gewebe im Fokus kurzzeitig auf über 1000 K, so dass thermische Ionisation ermöglicht wird. Bei noch kürzeren Pulsen (über Modenkopplung erzeugte ps- oder fs-Pulse) kommt es aufgrund des hohen Photonenflusses zu einer Photonenionisation. Liegt die Photonenenergie über der Ionisationsenergie, spricht man von *single-photon-process*. Andernfalls müssen mehrere Photonen miteinander koppeln, um die Ionisationsenergie zu erreichen, und man spricht von *multi-photon-process*.

Es kann also zu einer Ionisation von Atomen bzw. Molekülen kommen und somit zur Erzeugung freier Elektronen, sog. *lucky electrons*. Diese Elektronen dienen nun als Auslöser der Plasmabildung. Sie werden über das vorhandene Strahlungsfeld beschleunigt (inverse Bremsstrahlung) und geben schließlich ihre Energie durch Stoßionisation an andere Atome ab, die dann ihrerseits

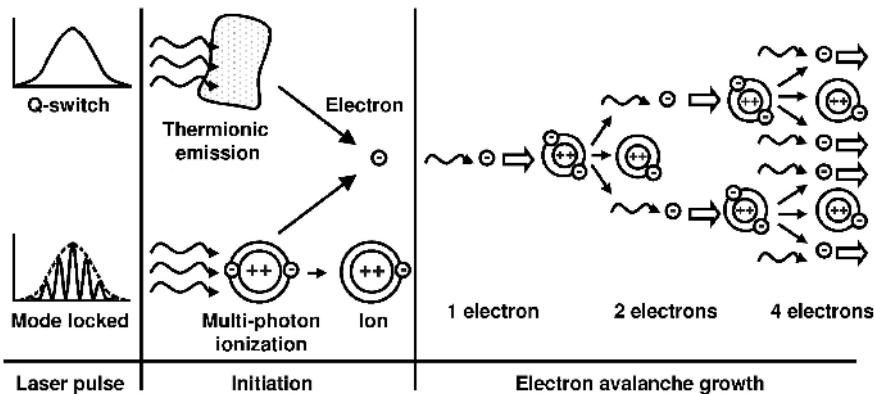


Abb. 15.11. Ionisation bei ns- und ps-Pulsen. Aus [9] nach Puliafito [12]

ionisieren. Dieser Prozess führt demnach zu einem lawinenartigen Anwachsen freier Ladungsträger (Abb. 15.11).

- (Multi)Photonenionisation: $M + (n) \cdot h\nu \rightarrow M^+ + e^- + E_{\text{kin}}$
- inverse Bremsstrahlung: $e^-(E) + A + h\nu \rightarrow e^-(E + \Delta E) + A$.

Das Zünden des Plasmas ist neben der erwähnten Leistungsdichte auch von der zeitlichen Länge der Laserpulse abhängig. Theoretische Berechnungen sowie Messungen (Abb. 15.12) zeigen im Bereich von *ns* und *ps* eine Abhängigkeit gemäß

$$\frac{E_{th}}{\sqrt{t_p}} = \text{const.} \quad (E_{th}: \text{Schwellwert der Energiedichte, } t_p: \text{Pulsdauer}).$$

Im Plasma herrschen elektrische Felder von $\approx 10^7 \text{ V/cm}$, die in der gleichen Größenordnung wie die atomaren und intramolekularen Coulomb-Felder liegen. Der Ablationsprozess beruht hier also einzig auf der ionisierenden Wirkung des Plasmas.

Nachdem das Plasma geziündet hat, nimmt es weitere Energie aus dem Strahlungsfeld auf, sodass es zu einer starken Aufheizung des Plasmas kommt. Diese Aufheizung ist mit einer schnellen Expansion des Plasmas verbunden, die zur Ausbreitung einer Schockwellenfront führt. Die Schockwellen zeichnen sich durch eine sehr hohe Druckamplitude (mehrere kbar in der Nähe des optischen Durchbruchs) aus. Die Front breitet sich anfangs mit Überschallgeschwindigkeit aus, geht dann aber bereits nach 100–200 μm in die normale Schallgeschwindigkeit über. Die Expansion der Schockwelle führt zu mechanischen Kräften im Gewebe, die zur Zerstörung der Zellen führen können.

Nachdem die Expansion des Plasmas nachlässt und die Schockwellenfront sich bereits vom Plasma abgelöst hat, macht sich eine Expansion der

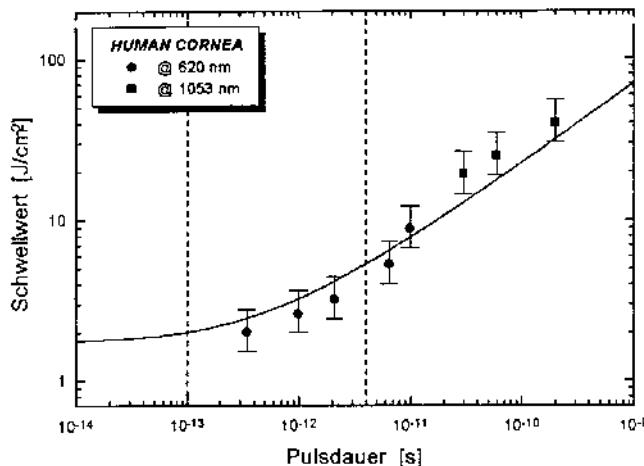


Abb. 15.12. Messung des Schwellwertenergieflusses für die plasmainduzierte Ablation als Funktion der Pulsdauer. Die Messungen wurden an menschlichen Hornhäuten bei 620 und 1053 nm Wellenlänge durchgeführt

entstandenen Gase und Dämpfe bemerkbar. Es beginnen sich sog. Kavitationsblasen auszubilden, deren Ausdehnung solange andauert, bis der statische Gewebedruck von außen den Blaseninnendruck übersteigt. Ist dies der Fall, beginnt die Blase wieder zu kollabieren, was zu einer Druck- und Temperaturzunahme führt. Damit sind die Voraussetzungen für die Bildung einer zweiten Blase gegeben. Messungen zeigten, dass das durch die Kavitationsblase verdrängte Gewebe sich nur teilweise wieder zurückzieht. Die Blasen können also zu Ablationskratern führen. Bei Ablation im flüssigen Medium kann sich während des Blasenkollapses ein Flüssigkeitsjet hoher Geschwindigkeit bilden, der ebenfalls stark zum Abtragungsprozess beiträgt. Diese Jetbildung entsteht vorwiegend am Ort derjenigen Blasen, die sich nahe an einer festen Begrenzung, z.B. der Ablationsgrenze befinden, da hier eine Asymmetrie im Außenraum der Blase herrscht, was zu einem ungleichmäßigen Kollabieren der Blase führt. Im Gegensatz zum sehr gezielten Ablationsprozess bei der plasmainduzierten Wechselwirkung wird hier das Gewebe in einem relativ großen Bereich abgetragen. Da zudem der Wechselwirkungsprozess vorwiegend mechanischer Natur ist, gibt es deutliche Qualitätsunterschiede in der Ablation, zugunsten der plasmainduzierten Abtragung [4, 8, 10]. In Abb. 15.13 ist die Abfolge der einzelnen Prozesse dargestellt. Abbildung 15.14 gibt den zeitlichen Ablauf der verschiedenen Stufen des Wechselwirkungsprozesses wieder.

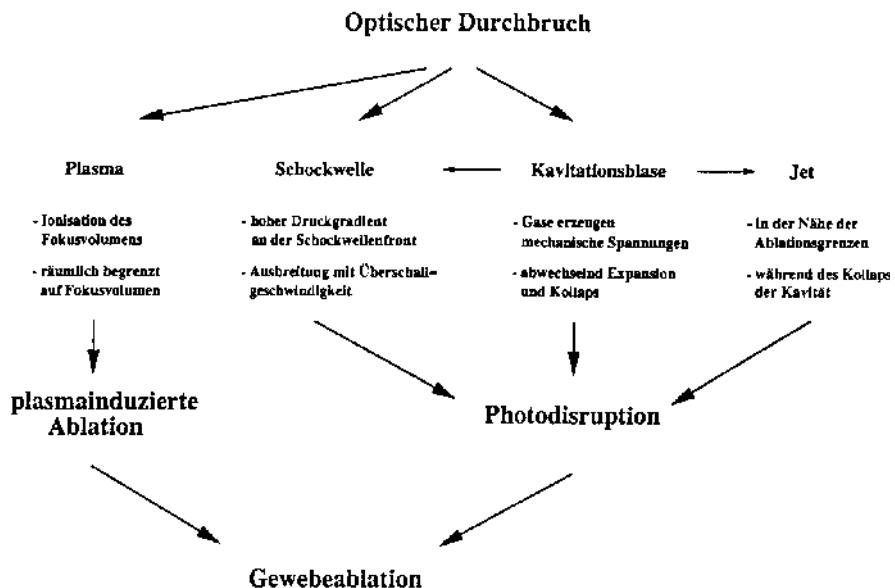


Abb. 15.13. Prozesse bei plasmainduzierter Ablation und Photodisruption

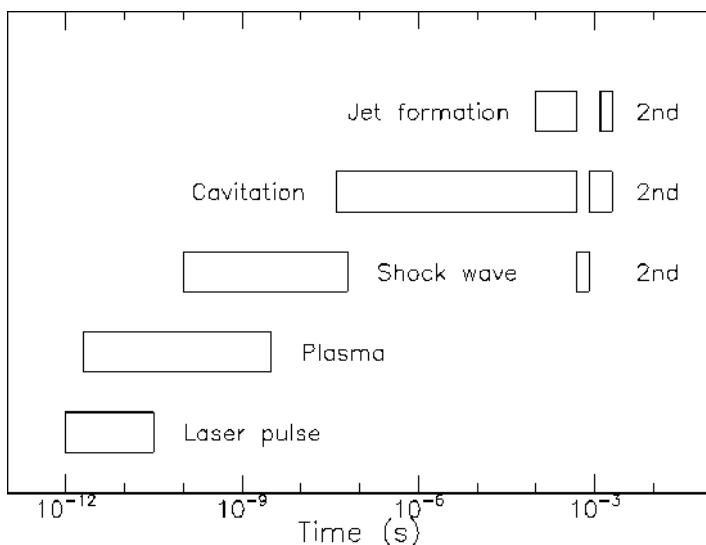


Abb. 15.14. Zeitlicher Verlauf der Wechselwirkungsprozesse bei der Photodisruption. Aus [9]

15.5.2 Theoretisches Modell der plasmainduzierten Ablation

Aufgrund der großen fokalen Intensitäten von 10^{10} W/cm^2 ergibt sich ein elektrisches Feld mit einer Stärke von 10^7 V/cm . Dieses führt über den in Kap. 15.5.1 erwähnten Multiphotonenprozess zur Bildung eines lokalen Mikroplasmas, welches mit seiner Expansion die Bildung einer Schockwelle auslöst.

Die Plasmaerzeugung lässt sich über eine komplexe dielektrische Funktion $e(\omega)$, mit

$$e(\omega) = 1 + \frac{\sigma}{i \cdot \omega \cdot \varepsilon_0}, \quad (15.17)$$

mit σ als elektrische Leitfähigkeit, ω als Laserfrequenz und der dielektrischen Konstanten ε_0 beschreiben. Der Imaginärteil von $e(\omega)$ beinhaltet den Absorptionskoeffizienten des Plasmas, der sich zu

$$\alpha_{pl}(\omega) = \omega \cdot \frac{Im(e)}{n \cdot c} = \frac{\nu_{ei} \omega_{pl}^2}{n \cdot c \cdot \omega^2} \quad (15.18)$$

ergibt, mit ν_{ei} als mittlere Elektron-Ion-Kollisionsrate, n als Brechungsindex und c als Lichtgeschwindigkeit. Die Plasmafrequenz ist definiert durch

$$\omega_{pl} = \sqrt{\frac{N_e \cdot e^2}{m \cdot \varepsilon_0}}, \quad (15.19)$$

dabei ist N_e die freie Elektronendichte, e die Elektronenelementarladung und m Elektronenmasse.

Die mittlere freie Weglänge der Elektronen ist gegeben durch

$$\lambda = v \cdot t_0 = (N_e \cdot \sigma)^{-1} \quad (15.20)$$

mit v als mittlerer Geschwindigkeit der Plasmaelektronen, t_0 als mittlerer Zeitdauer zwischen zwei Stößen und σ als Streuquerschnitt der Stöße. Die Geschwindigkeit v und der Wirkungsquerschnitt σ sind nur von der Temperatur abhängig. Daraus folgt

$$\nu_{ei} = \frac{1}{t_0} \sim N_e. \quad (15.21)$$

Aus (15.18), (15.19) und (15.21) lässt sich folgende Beziehung herstellen:

$$\alpha_{pl} \sim N_e^2 \sim E^2, \quad (15.22)$$

mit E als Energie des Laserpulses, unter der Annahme, dass zur Dissoziation eines Elektrons konstante Anzahlen von Photonen notwendig sind.

In Abb. 15.15 ist die Geometrie der plasmainduzierten Ablation dargestellt. Die Expansion des Plasmas löst eine Schockwelle mit Druck p , Volumen V und Eindringtiefe x aus

$$p = \frac{\delta E}{\delta V} = \frac{1}{4\pi x^2} \frac{\delta E}{\delta x}. \quad (15.23)$$

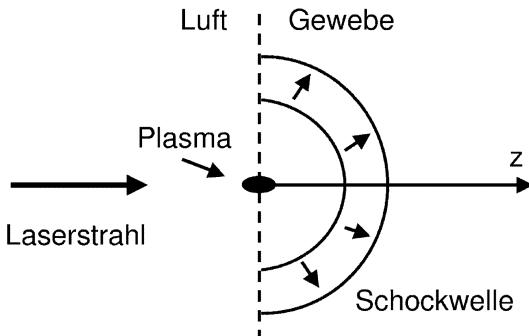


Abb. 15.15. Geometrie der plasmainduzierten Ablation. Aus [9]

Mit

$$\frac{\delta E}{\delta x} = -\alpha_{pl} E \quad (15.24)$$

folgt:

$$p \sim \frac{E^3}{x^2} . \quad (15.25)$$

Die Ablation geht nun bis in die Tiefe, bei der der Druck den Schwellwert p_0 unterschreitet, der im Wesentlichen von den elastischen Eigenschaften des Gewebes, also dessen mechanischem Zusammenhalt, abhängig ist. Die Ablationstiefe ergibt sich somit zu

$$x \sim E^{1,5} . \quad (15.26)$$

Für hohe Energiedichten kann man davon ausgehen, dass α_{pl} konstant ist. Damit folgt aus (15.23) und (15.24):

$$p \sim \frac{E}{x^2} , \quad (15.27)$$

woraus sich eine Ablationstiefe von

$$x \sim E^{0,5} \quad (15.28)$$

ergibt. Die tatsächliche Ablation wird sich als Mischung aus beiden Effekten ergeben. In den Abb. 15.16 und 15.17 sind die experimentellen Ablationskurven für Hornhaut- bzw. Hirngewebe wiedergegeben.

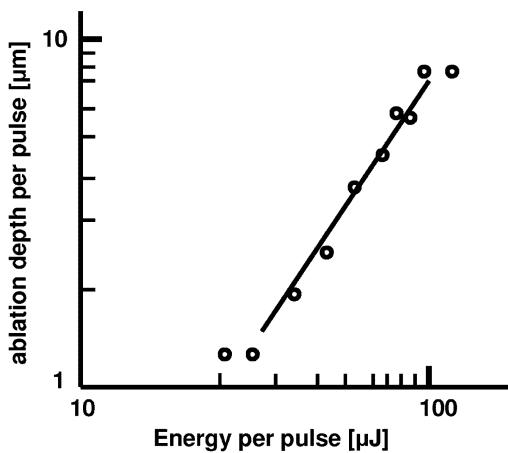


Abb. 15.16. Experimentelle Ablationskurve für menschliche Hornhaut (Pulsdauer 60 ps)

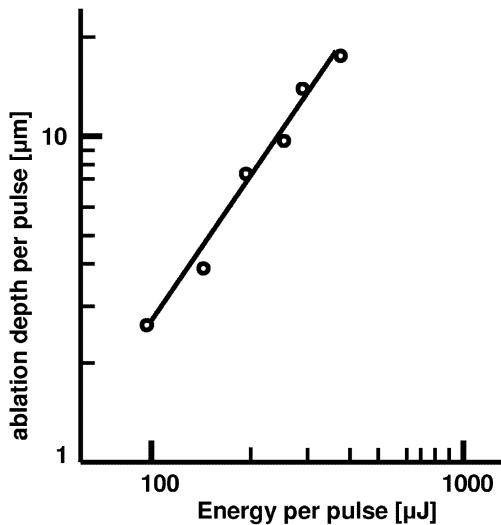


Abb. 15.17. Experimentelle Ablationskurve für Hirngewebe (Pulsdauer 60 ps)

15.5.3 Dynamik des Ablationsprozesses

Die bisher diskutierten photodisruptiven/plasmainduzierten Ablationsprozesse sind in Abb. 15.18 hinsichtlich ihrer zeitlichen Entwicklung zusammengefasst.

Plasma. Die Lebensdauer des Plasmas beträgt ca. 10–20 ns (Abb. 15.18). Aufgrund der begrenzten Bandbreite der Photodiode ($t_\tau \approx 1$ ns) kann die

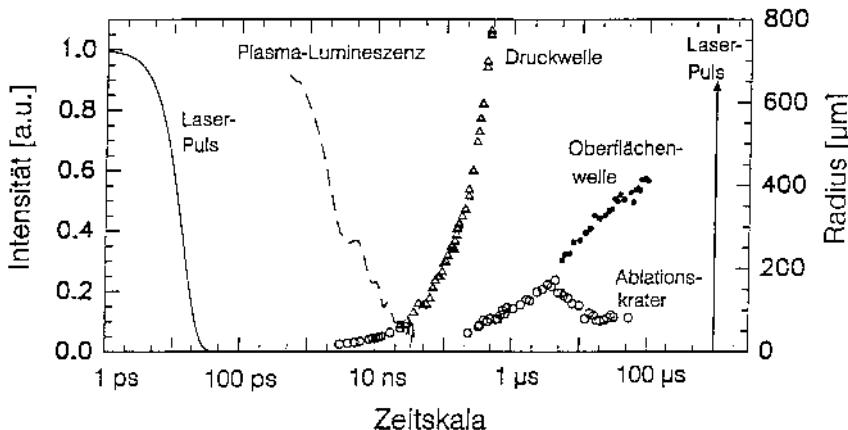


Abb. 15.18. Zeitskala der laserinduzierten Prozesse. Das Maximum des Laserpulses ($\text{FWHM} = 24 \text{ ps}$) definiert den Zeitpunkt $t = 0$

Entstehung des Plasmas auf der Pikosekundenskala nicht wiedergegeben werden. Das Plasma ermöglicht eine effiziente Einkopplung der Laserenergie auch in transparente Medien. Aus den gemessenen Spektren kann eine mittlere Elektronendichte von $1 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^{-3}$ sowie eine mittlere Temperatur von 5000–7000 K abgeschätzt werden. Umliegendes Gewebe wird durch diese Plasmatemperaturen nicht geschädigt, da aufgrund der kurzen Lebensdauer keine thermische Diffusion auftreten kann.

Schockwelle. Die bei der Expansion des Plasmas entstehende Druckwelle ist für den größeren Anteil der Gewebeablation verantwortlich. Die Druckwelle breitet sich im Gewebe aus und bewirkt in dem Bereich, in welchem der Druckanstieg die Gewebewiderstandskraft überschreitet, einen zusätzlichen mechanischen Aufbruch. Aktuelle Studien legen nahe, dass der Einfluss der Schockwelle bei ultrakurzen Pulsen mittlerer Energie abnimmt. Für sub-200-fs-Pulse zeigt sich ein Schädigungsradius der Schockwelle von unter $100 \mu\text{m}$ (Abb. 15.19).

Kavitation und Gewebeverdrängung. Es wird vermutet, dass die Expansion des im Fokus erzeugten Gases sowohl zur Vaporisation und anschließenden Kondensation von umliegendem Gewebe als auch zur disruptiven Demarkation von ganzen Fragmenten führt und damit letztendlich für die eigentliche Gewebeabtragung verantwortlich ist.

Ablationsfragmente. Die Ablationsfragmente werden mit einer anfänglichen Auswurfgeschwindigkeit von mehr als 700 m/s herausgeschleudert. Da es

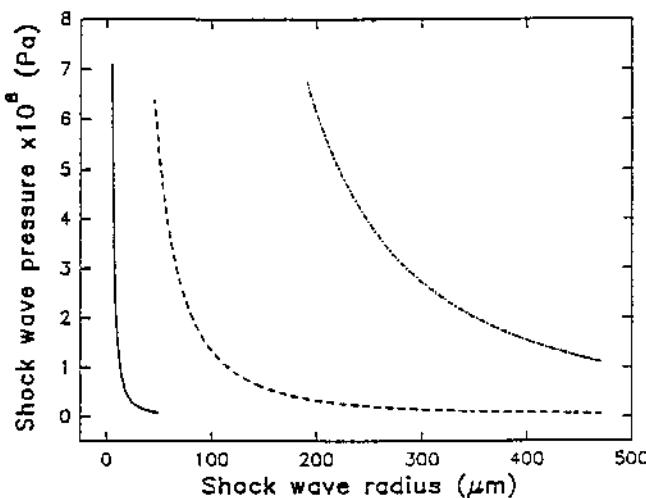


Abb. 15.19. Druckamplitude der Schockwelle in Corneageweben in Abhängigkeit vom Radius. Durchgezogene Linie: 160 fs, 0.9 μJ ; gestrichelte Linie: 18 ps, 510 μJ ; strichpunktuierte Linie: 7 ns, 11 mJ

sich nicht um einzelne Partikel, sondern um einen kompakten Strahl handelt, kann experimentell lediglich die Auswurgeschwindigkeit der ersten Fragmente abgeschätzt werden. Grundsätzlich kann eine Traumatisierung von Gewebestrukturen, die von einem solchen „Jet“ getroffen werden, nicht ausgeschlossen werden. Bei der Oberflächenablation werden die Ablationsfragmente aber in der dem Laserpuls entgegengesetzten Richtung herausgeschleudert und können somit kaum zu einer Schädigung von angrenzenden Arealen führen.

Literatur

1. Bille JF, Schlegel W, Sturm V (1993) Stereotaktische Laser-Neurochirurgie. Physik in unserer Zeit 24:280–286
2. Boulnois JL (1986) Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. Lasers Med Sci 1:47–66
3. Fantes FE, Waring GO (1989) Effect of eximer laser radiant exposure on uniformity of ablated corneal surface. Lasers Surg Med 9:533–542
4. Fischer JP, Dams J, Götz MH, Kerker E, Loesel FH, Messer CJ, Niemz MH, Suhm N, Bille JF (1994) Plasma-mediated ablation of brain tissue with picosecond laser pulses. Appl Phys B 58:493–499
5. Foote CS (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. Science 162:963–970
6. Garrison BJ, Srinivasan R (1985) Laser ablation of organic polymers: microscopic models for photochemical and thermal processes. J Appl Phys 57:2909–2914

7. van Gemert MJC, Welch AJ (1989) Time constants in thermal laser medicine. *Lasers Surg Med* 9:405–421
8. Loesel FH, Fischer JP, Götz MH, Horvath C, Juhasz T, Noack F, Suhm N, Bille JF (1998) Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses. *Appl Phys B* 66:121–128
9. Niemz MH (1996) Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
10. Niemz MH, Klancnik EG, Bille JF (1991) Plasma-mediated ablation of corneal tissue at 1053 nm using a Nd:YLF oscillator/regenerative amplifier laser. *Lasers Surg Med* 11:426–431
11. Niemz MH, Loesel FH, Fischer M, Lappe C, Bille JF (1994) Surface ablation of corneal tissue using UV, green and IR picosecond laser pulses. *Proc SPIE* 2079:131–139
12. Puliafito CA, Steinert RF (1984) Short-pulsed Nd:YAG laser microsurgery of the eye: biophysical considerations. *IEEE J Qu Electron* QE-20:1442–1448
13. Sutcliffe E, Srinivasan R (1986) Dynamics of UV laser ablation of organic polymer surfaces. *J Appl Phys* 60:3315–3322
14. Weinberg WS, Birngruber R, Lorenz B (1984) The change in light reflection of the retina during therapeutic laser-photocoagulation. *IEEE J Qu Electron* QE-20:1481–1489
15. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ (1986) Identification of singlet oxygen as the toxic agent in photoactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 36:2326–2331

16 Laser in der Augenheilkunde

J.F. Bille und M.H. Niemz

In der Augenheilkunde wird heute bereits eine Vielzahl verschiedener Laser für diagnostische und therapeutische Zwecke eingesetzt. In diese beiden Anwendungsbereiche gliedert sich entsprechend auch dieser Übersichtsartikel. In der Diagnose bietet der Laser dann Vorteile, wenn die üblichen nichtkohärenten Strahlungsquellen versagen. Durch hochspezialisierte Lasermikroskopie lassen sich frühzeitig Veränderungen an der Netzhaut feststellen, bevor sie der Augenarzt mit konventionellen Methoden erkennen kann. Dies kann gerade bei Langzeiterkrankungen wie dem grünen Star von großer Bedeutung sein. Für die Therapie mit dem Laser werden im Wesentlichen drei Wechselwirkungsarten mit Gewebe genutzt:

- die thermische Wechselwirkung, die in diesem Fall vorwiegend koagulierend wirkt (d.h. sich auf die Denaturierung von Proteinen beschränkt),
- die photoablativen Wechselwirkung zur Abtragung von Gewebe und
- die plasmainduzierte Wechselwirkung, d.h. die gezielte lokale Zerstörung von Gewebe durch Erzeugung eines Mikroplasmas [5].

Die Art der Wechselwirkung wird primär durch deren Zeitdauer und daher direkt durch die Laserpulsdauer bestimmt (Abb. 16.1). Tabelle 16.1 gliedert die Laserquellen in der Augenheilkunde nach ihrem historischen Einsatz. Tabelle 16.2 gibt einen Überblick über die für die Augenheilkunde relevanten Wechselwirkungsarten zwischen Laserlicht und Gewebe.

Tabelle 16.1. Lasersysteme in der Augenheilkunde

Lasersystem	Wellenlängen	Erster klinischer Einsatz
Rubinlaser	694,3 nm	1963
Argonlaser	457–524 nm	1968
Kryptonlaser	647,1 nm (rot) 568,2 nm (gelb) 530,8 nm (grün)	1972
CO ₂ -Laser	10,6 μm	1972
Farbstofflaser	diverse	1979
Nd:YAG-Laser	1,064 μm	1980
Excimerlaser (ArF)	193 nm	1983
Ho:YAG-Laser	2,06 μm	1990
Nd:YLF-Laser	1,053 μm	1991

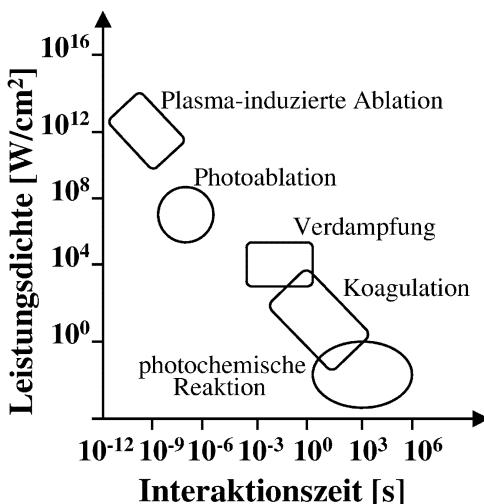


Abb. 16.1. Übersicht der Laser-Gewebe-Wechselwirkung

Tabelle 16.2. Wechselwirkungsarten von Laserlicht mit Gewebe

Wechselwirkungsart	Pulsdauer	Lasertyp	Effekt (Beispiel)
Thermisch	cw oder μ s	Ar, CO_2 , Krypton	Koagulation (Netzhaut)
Photoablativ	nsec	Excimer	Gewebeabtragung (Hornhaut)
Plasmainduziert	psec	Nd:YAG, Nd:YLF	Gewebezer- trümmerung (Linse), Gewebe- abtragung (Horn- haut)

Das erste und wohl bekannteste Anwendungsgebiet, die Laserkoagulation von Netzhautablösungen, stellt heute noch einen kleinen Teil aller in der Augenheilkunde praktizierten Anwendungen dar. Insbesondere auf dem Gebiet der Glaukom- und Katarakterkrankungen (grüner, grauer Star) sind viele neue Laseranwendungen hinzugekommen: die Öffnung des Trabekelwerks, eine Durchbohrung der Iris, die Verflüssigung der Augenlinse u.a. Ein neues interessantes Anwendungsgebiet verspricht auch die refraktive Hornhautchirurgie zu werden. Ziel einer solchen Operation ist es, durch eine gezielte Änderung der Brechkraft der Hornhaut die Gesamtbrechkraft des Auges dahingehend zu verändern, dass in vielen Fällen von Fehlsichtigkeit eine Brillenkorrektur überflüssig wird. Auf welchem Stand die Forschung jeweils ist

und welche Laser dabei eingesetzt werden, wird ebenfalls in diesem Artikel diskutiert.

16.1 Diagnostische Laseranwendungen

In der Augenheilkunde wird die Abbildung und Dokumentation des menschlichen Auges üblicherweise mit klassischen optischen Methoden durchgeführt (Spaltlampe, Augenspiegel, Funduskamera). Die Laserscaningophthalmoskopie und -tomographie stellen neue Entwicklungen für die Augendiagnostik dar. Diese optoelektronischen Instrumente basieren auf einer abtastenden Beleuchtung der Netzhaut, Linse oder Hornhaut durch einen leistungsarmen Laserstrahl (ca. $10\text{ }\mu\text{W}$) und auf einer modifizierten Videobilderzeugung.

Die in Heidelberg entwickelte „Optical-Sectioning“-Methode („Augentomograph“) erlaubt eine bisher unerreichte Detailauflösung der Mikroanatomie verschiedener Abschnitte des menschlichen Auges [4]. Durch die konfokale Detektion des an den verschiedenen Gewebebeschichten des Auges reflektierten Laserlichts gelingt es, die Bildinformation auf den Schärfentiefenbereich des abbildenden Systems einzuschränken. Das Prinzip der konfokalen Abbildung im Fall des Augentomographen zeigt Abb. 16.2. Der beleuchtende Laserstrahl (nicht eingezeichnet) wird durch die brechenden Medien des Auges auf eine Ebene in der Nähe der Netzhaut des Auges fokussiert. Diese Fokalebene kann durch eine Fokussieroptik frei gewählt werden. Das von der beleuchteten Gewebebeschicht im Auge zurückreflektierte oder gestreute Licht wird auf ein Pinhole vor dem Detektor abgebildet. Das Pinhole ist in einer Ebene angebracht, die zu der gerade beleuchteten Fokalebene im Auge konjugiert ist. Damit ist sichergestellt, dass nur dasjenige Licht detektiert wird, das aus der gerade beleuchteten Fokalebene im Auge kommt; Licht aus anderen Ebenen wird durch das Pinhole abgeblockt und damit nicht registriert.

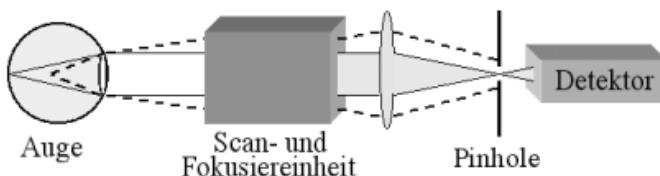


Abb. 16.2. Konfokales Prinzip zur Detektion des Augeshintergrundes. *Schraffierte Fläche:* Abbildung der Fokalebene. *Gestrichelter Strahlengang:* Abbildung einer defokussierten Ebene

16.1.1 Laserscanningtomographie zur Glaukomdiagnostik („grüner Star“)

Die Laserscanningtomographie ermöglicht die quantitative, dreidimensionale Strukturanalyse des „blinden Flecks“ (auch Sehnervenfaserkopf oder Papille genannt) auf der Netzhaut (Kap. 1.1.1 und Abb. 1.1). Damit ergibt sich eine Diagnostikmöglichkeit für glaukomatóse Erkrankungen („grüner Star“).

Beim grünen Star ist der Augeninnendruck (normalerweise bei 12 bis 22 mm Hg) zu hoch. Eine pathologische Erhöhung des Innendrucks liegt vor, wenn dieser bei wiederholten Messungen über 22 mm Hg liegt. Beim akuten Glaukomanfall kann der Druck bis über 60 mm Hg ansteigen. Der Innendruck hängt vor allem von dem Verhältnis des kontinuierlich produzierten und abfließenden Kammerwassers ab. Plasmaflüssigkeit tritt aus den Blutkapillaren aus und fließt als Kammerwasser in die hintere Augenkammer ab. Von dort gelangt es in die vordere Augenkammer, aus der es schließlich über das Trabekelwerk durch den Schlemm-Kanal in das venöse Gefäßsystem abfließen kann (Abb. 16.3).

Infolge einer Abflussbehinderung bei normaler Kammerwasserproduktion steigt der Augeninnendruck an. Beim chronischen Glaukom wölbt sich dann die mechanisch schwächste Stelle, die Lamina cribrosa, nach außen, wodurch die Sehnervfasern geschädigt werden können. Der Ausfall von Nervenfasern ist gleichbedeutend mit einer Erblindung der Stellen, von denen diese Fasern die Reizsignale übertragen sollen. Mit zunehmender glaukomatóser Schädigung ergibt sich eine Vergrößerung der Papillenexkavation. Obwohl es seltene Fälle von glaukomatósen Gesichtsfeldausfällen ohne sichtbare Veränderung der Papille gibt, zeigt der Großteil von Patienten mit erhöhtem Augeninnendruck eine Vergrößerung des Papillenvolumens, lange bevor ein Gesichtsfeldausfall messbar ist.

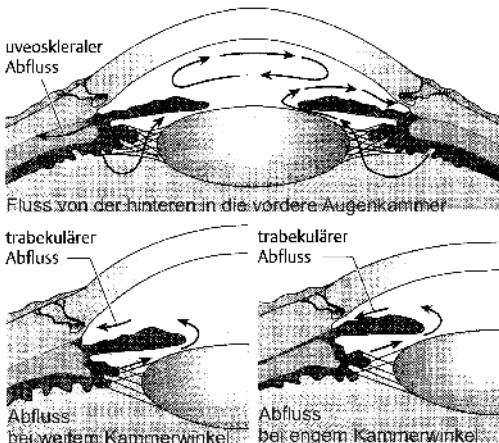


Abb. 16.3. Strukturen des vorderen Segments. Die *Pfeile* zeigen die Flussrichtung des Kammerwassers

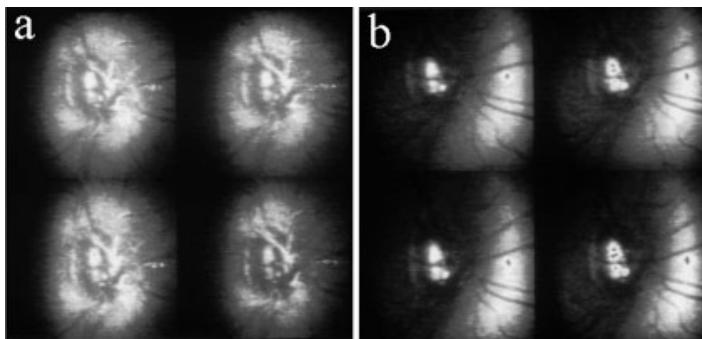


Abb. 16.4. Schnittbilder des Nervenfaserkopfes („Papile“). (a) Vier benachbarte Ebenen im Randbereich, (b) im Boden („Lamina cribrosa“). Ebenenabstand: 50 µm

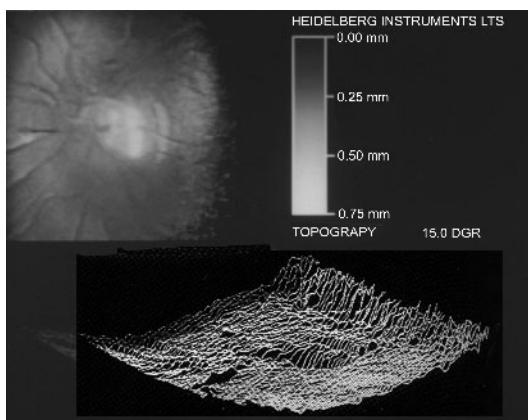


Abb. 16.5. Topographie der Netzhaut im peripapillären Bereich. Die Tiefenskala ist in Grauwerten geeicht

Abbildung 16.4 zeigt die Aufnahme einer tomographischen Schnittbildserie des Sehnervenkopfes. Es werden typischerweise 32 Schnittbilder in Richtung des Laserstrahls im Abstand von 30–60 µm aufgenommen. Aus der tomographischen Bildserie kann im Rechner ein Summenbild und ein topographisches Bild des Sehnervkopfes erstellt werden (Abb. 16.5). Seit 1988 sind in vielen Kliniken im In- und Ausland ausgedehnte Studien zur Bedeutung dieses neuen Diagnostikverfahrens durchgeführt worden [15].

16.1.2 Aktiv-optische Verbesserung der Tiefenauflösung

Die Tiefenauflösung des beschriebenen Augentomographen ist durch die optischen Eigenschaften des Auges begrenzt. Die transversale Auflösung beträgt etwa 10 µm, während die Tiefenauflösung für schwachkontrastige Objekte auf etwa 300 µm begrenzt ist. Allerdings lässt sich die Tiefenposition von

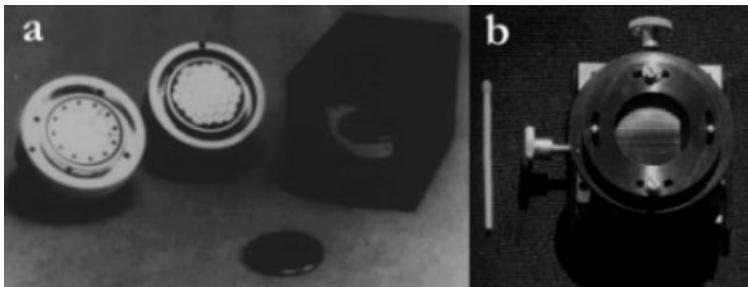


Abb. 16.6. Aktiv-optische Komponenten. (a) Aktiver Spiegel, (b) Wellenfrontsensor

Schichten mit starkem Kontrast wie die Oberfläche der Netzhaut sehr viel genauer angeben, da nur die Position höchster Reflektivität bestimmt werden muss. Es ergibt sich daraus eine Genauigkeit von etwa $50\text{ }\mu\text{m}$ für die Höhenposition im Topographiebild der Netzhaut.

Die Tiefenauflösung des Augentomographen zu verbessern, müssen aktiv-optische Komponenten zur Kompensation der optischen Aberrationen des Auges eingesetzt werden. Durch Weiten der Pupille auf etwa 6 mm ergibt sich theoretisch eine um eine Größenordnung verbesserte beugungsbegrenzte Tiefenauflösung von etwa $30\text{ }\mu\text{m}$. Allerdings ist die Auflösung des Auges mit geweiteter Pupille wegen des Astigmatismus der Hornhaut, der sphärischen Abberation der Linse und Verzerrungen höherer Ordnungen (Dezentrierung, Koma u.a.) nicht beugungsbegrenzt. Die äußeren Bereiche von Hornhaut und Linse modifizieren die Phase des einfallenden und des reflektierten Laserstrahls, wodurch das Punktbild im Fokalbereich sehr viel ausgedehnter ist, als es der beugungsbegrenzten Grenze entsprechen würde. Mit Hilfe eines Wellenfrontsensors lassen sich die Phasenstörungen messen und die optische Übertragungsfunktion des Auges bestimmen. Damit kann die Tiefenauflösung entweder offline mit einer Dekonvolutionsrechnung oder online mit Hilfe eines aktiven Spiegels verbessert werden [3, 15]. Die in Heidelberg entwickelten Gerätekomponenten – Hartmann-Shack-Wellenfrontsensor (Linsenarray mit Fokal-Array-CCD-Sensor) und aktiver Spiegel (Multielektrodenfolienspiegel) – sind in Abb. 16.6 dargestellt.

16.1.3 Fourier-ellipsometrische Vermessung der Nervenfaserschicht

Ein gegenüber der topographischen Vermessung der Papillenexcavation empfindlicheres Anzeichen für eine beginnende glaukomatóse Erkrankung ist die abnehmende Dicke der Nervenfaserschicht und damit die Abnahme der Anzahl der Nervenfasern, die den Sehnerv bilden. Histologische Studien an glaukomerkrankten Patienten zeigten, dass bei einigen dieser Augen die Anzahl der Nervenfasern auf 2/3 bis 1/2 der erwarteten Durchschnittswerte

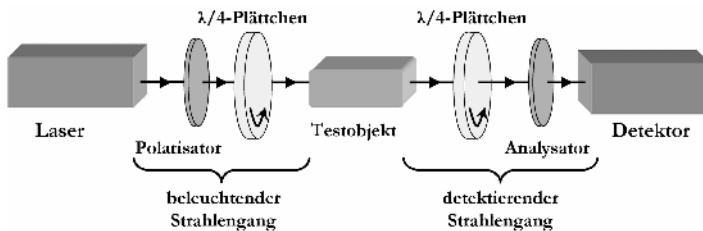


Abb. 16.7. Prinzipieller Aufbau eines Fourier-Ellipsometers

zurückgegangen war, ohne dass ein Gesichtsfeldausfall festgestellt wurde. Da die Nervenfasern doppelbrechend sind, bietet sich eine polarisationsoptische Methode zur Bestimmung der Schichtdicke an.

Ein Fourier-Ellipsometer besitzt im einfachsten Fall einen Aufbau, wie er in Abb. 16.7 dargestellt ist. Die beleuchtenden und detektierenden Strahlen werden durch zwei rotierende $\lambda/4$ -Plättchen in ihrem Polarisationszustand moduliert. Das resultierende Photomultipliersignal wird Fourier-transformiert. Aus dem Fourier-Koeffizienten lassen sich der Betrag der Doppelbrechung und die Richtung der Hauptachsen der doppelbrechenden Ellipse ermitteln. Handelt es sich bei dem Testobjekt um eine Netzhaut *in vivo*, so durchquert der Laserstrahl die Nervenfasern, wird von der Netzhaut reflektiert und durchläuft dann nochmals die Nervenfaserschicht.

Durch Integration des Fourier-Ellipsometers in den Augentomographen ist es gelungen, die flächige Verteilung der doppelbrechenden Strukturen auf der Netzhaut zu messen (Abb. 16.8). Die Genauigkeit der Messung der Nervenfaserschichtdicke liegt bei etwa 20%. Dabei entspricht eine Phasendrehung von 1° etwa einer Schichtdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ [4].

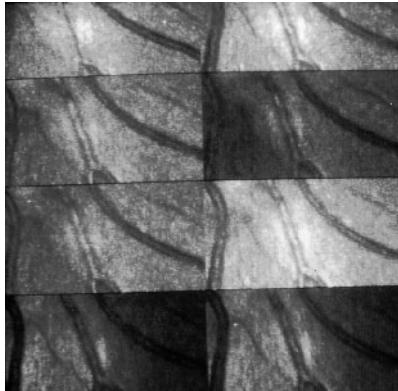


Abb. 16.8. Acht Bilder der peripapillären Region mit unterschiedlichen Polarisationszuständen

16.2 Therapeutische Laseranwendungen

Die therapeutischen Laseranwendungen in der Augenheilkunde lassen sich grob in zwei Bereiche einteilen: Anwendungen in den hinteren und in den vorderen Augenabschnitten. Zu den hinteren Augenabschnitten gehören u.a. die Netzhaut, der Glaskörper, die Linse und die Iris (s. Abb. 16.3). Zu den vorderen Abschnitten zählen die Hornhaut, die Sklera und das Trabekelwerk. Im Folgenden werden die einzelnen Anwendungsgebiete beschrieben und diskutiert.

16.2.1 Die Netzhaut

Meyer-Schwickerath untersuchte von 1945 bis 1949 als erster Augenarzt die Koagulation der Netzhaut mit Sonnenlicht für therapeutische Zwecke [11]. Wegen der ungünstigen Operationsbedingungen führte er ab 1956 seine Untersuchungen mit einer Xenonbogenlampe weiter. Nach der Erfindung des ersten Rubinlasers durch Maiman im Jahre 1960 wurde dieser Laser bereits einige Jahre später für Operationen an Patienten eingesetzt. Es zeigte sich, dass der Rubinlaser sehr geeignet war, um die Netzhaut (Retina) mit der darunter liegenden Aderhaut (Chorioidea) zu verschweißen, das er aber keine Gefäße verschließen und somit keine Blutungen stillen konnte. L'Esperance fand einige Jahre später heraus, dass sich hierfür der Argon-Ionen-Laser wesentlich besser eignet [8]. Das Licht im blaugrünen Wellenlängenbereich wird stark im Hämoglobin des Blutes absorbiert und sorgt für eine Koagulation der Gefäße. Bei typischen Einwirkzeiten von 0,1–1 s und mittleren Leistungen von 0,1–1 W wird die kontinuierlich abgestrahlte Energie vollständig in Wärme umgewandelt. Anfang der 70er Jahre wurden von der gleichen Gruppe zwei weitere Laser untersucht: der Kryptonlaser bei 568 nm (gelb) und der Kryptonlaser bei 647 nm (rot). Diese beiden Laser gewannen immer mehr Bedeutung bei der Behandlung von Erkrankungen der Macula, dem Ort des schärfsten Sehens. Abbildung 16.9 zeigt die unterschiedlichen Koagulationszonen der wichtigsten Laser und vergleicht sie mit der globalen Koagulation der Xenonlampe. Die Vorteile des Lasers, insbesondere die genaue Lokalisierung, werden aus dieser Abbildung unmittelbar ersichtlich.

Die drei wichtigsten Indikationen für eine Laserbehandlung der Netzhaut sind die folgenden:

- Netzhautlöcher,
- Netzhautablösung und
- diabetische Retinopathie.

Bei *Netzhautlöchern* geht es darum, deren weitere Vergrößerung zu verhindern. Dies geschieht durch ringförmige Laserapplikationen um das Loch, wobei die Netzhaut mit der darunter liegenden Aderhaut verschweißt wird. Diese Koagulationen halten so gut, dass ein weiteres Einreißen der Löcher unterbleibt.

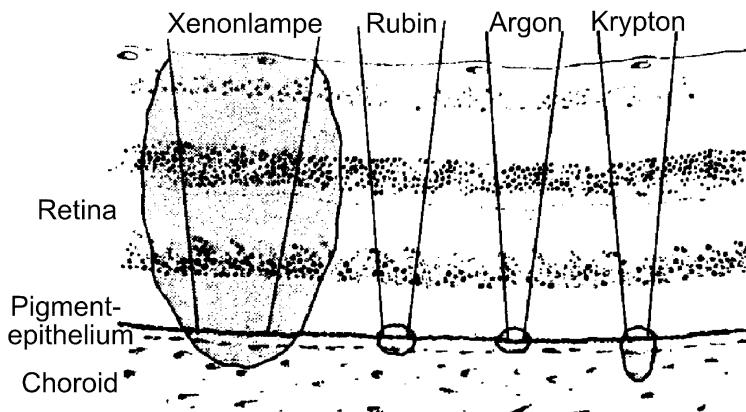


Abb. 16.9. Applikationsorte verschiedener Laser in der Netzhaut

Netzhautablösungen sind meistens die Folge von nichterkannten Rissen in der Netzhaut. Begünstigt werden diese bei kurzsichtigen Patienten (Myopie), da hier der Glaskörper eine erhöhte Zugkraft nach vorne ausübt. Auch hier kann die Netzhaut durch Laserkoagulationen wieder angeheftet und ein weiteres Aufbrechen der Risse verhindert werden.

Bei der *diabetischen Retinopathie* befindet sich infolge von Stoffwechselstörungen zu wenig Sauerstoff im Blut. Dies kann in schwereren Fällen zu teilweisen Gesichtsfeldausfällen führen. Um den Patienten dennoch ein scharfes Sehen zu ermöglichen, sollte wenigstens die Fovea (s. Abb. 16.3) ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Deshalb führt man eine panretinale Koagulation durch, nach der nur noch der foveale Bereich durchblutet wird. Hierzu sind bis zu 1000 Einzelkoagulationen auf der gesamten Netzhaut außerhalb der Fovea durchzuführen.

Bei allen drei Indikationen nutzt man den thermischen Effekt der Bestrahlung. Dabei werden Proteine denaturiert und Enzyme inaktiviert, was schließlich zu einer Blutgerinnung und Koagulation führt. Es handelt sich also um eine rein thermische Wechselwirkung, bei der allerdings nur Temperaturen bis ca. 65°C erreicht werden sollten. Höhere Temperaturen würden zu einer unnötigen Karbonisation und explosionsartigen Verdampfung des Gewebes führen. Eine exakte Lokalisierung der Gefäße und eine genaue Dosierung der Laserstrahlung ist folglich unbedingt notwendig. Tabelle 16.3 gibt einen Überblick über die thermischen Effekte in Abhängigkeit von der Temperatur.

16.2.2 Die Linse

Aron-Rosa hat 1980 zum ersten Mal eine Nachstaroperation mit einem Nd:YAG-Laser durchgeführt [1]. Der Nd:YAG-Laser ist ein Festkörperlaser, der bei einer Wellenlänge von 1064 nm emittiert. In der damaligen Arbeit

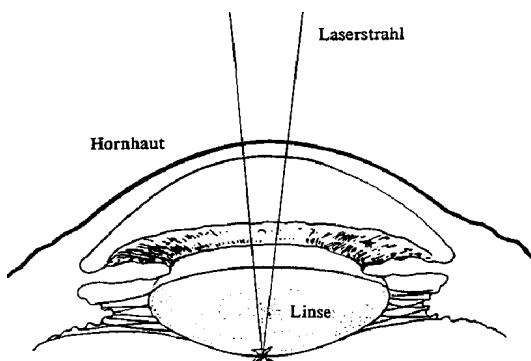
Tabelle 16.3. Thermische Effekte der Laserstrahlung

Temperatur (°C)	Effekt
37	Normal
45	Hyperthermie
50	Abnahme der Enzymaktivität
62	Proteindenaturierung, Koagulation
80	Kollagendenaturierung, Karbonisation
100	Verdampfung

wurde ein gütegeschalteter Nd:YAG-Laser mit einer Pulsdauer von 30 ns verwendet. Bei typischen Pulsennergien von 5 mJ und Fokusgrößen von 50 µm erreicht man Leistungsdichten von über 10^{10} W/cm^2 . Dies reicht aus, um lokal einen optischen Durchbruch zu erzeugen und störende Membranen zu zerstören.

Beim grauen Star hat sich die Augenlinse so stark getrübt, dass sie operativ entfernt werden muss. Bei den herkömmlichen Methoden wird die Linse mit Ultraschall zertrümmert und durch eine Kanüle abgesaugt. Anschließend kann der Patient zwischen einer Starbrille (15 dpt) oder der Implantation einer Kunstlinse aus Silikon wählen. Im Fall einer Kunstlinse bilden sich jedoch oft trübe Nachstarmembranen, die dann z.B. mit einem Nd:YAG-Laser entfernt werden können. Dadurch bleibt dem Patienten eine zweite Operation mit Öffnung des Auges erspart.

Bei einer solchen Nd:YAG-Laseroperation wird i. Allg. mit einem HeNe-Laser als Ziellaser gearbeitet. Mit ihm fokussiert man auf die hintere oder auch vordere Linsenkapsel. Anschließend werden mit dem Nd:YAG-Laser mehrere Schnitte gefahren, bis sich die Membran wie ein Reißverschluss auftrennt. Abbildung 16.10 zeigt einen schematischen Querschnitt durch die Linse während einer solchen Laseroperation.

**Abb. 16.10.** Entfernung einer Nachstarmembran (schematisch)

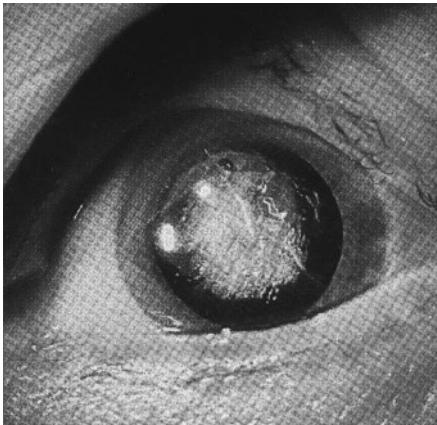


Abb. 16.11. Patientenauge nach Verflüssigung des gertübtten Linsenkerns

Diese Operation kann bei entsprechender Fokussierung so durchgeführt werden, dass weder die Hornhaut noch die Netzhaut des Patienten einen Schaden davontragen. Auch der Innendruck des Auges bleibt dabei unverändert. Der Augenarzt kann die gesamte Operation durch eine Spaltlampe verfolgen. Ein entsprechend gewählter Strahlteiler sorgt dafür, dass der Augenarzt selbst von der Laserstrahlung abgeschirmt ist.

Mit neueren Methoden ist es sogar möglich, auf den Ultraschall ganz oder teilweise zu verzichten. Durch den Einsatz eines Pikosekunden-Nd:YLF-Lasersystems kann das Linseninnere ebenfalls zertrümmert und verflüssigt werden (Abb. 16.11). Der Vorteil gegenüber Nanosekundenpulsen liegt in der geringeren Pulsennergie, die für einen optischen Durchbruch notwendig ist. Damit reduzieren sich gleichzeitig das Plasmavolumen, die Amplitude der generierten Schockwelle und die Schadensreichweite im umliegenden Gewebe.

16.2.3 Die Iris

Beckman benutzte 1973 zum ersten Mal einen Laser, um ein Loch in die Iris zu bohren [2]. Diese Operation nennt sich Iridotomie und gilt als Therapiemöglichkeit für den grünen Star (Glaukom). Eine frühzeitige Diagnose, z.B. mit dem beschriebenen Augentomographen, ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie. Medikamentös kann der Augeninnendruck nur begrenzt abgesenkt werden. In vielen Fällen ist eine chirurgische Operation unabdingbar. Je nach Ursache können hierbei verschiedene Techniken angewandt werden, da es immer am sinnvollsten ist, die Ursache zu bekämpfen.

Beim primärchronischen Glaukom, bei dem i. Allg. der Schlemm-Kanal im Trabekelwerk verstopft ist, wird meist eine Lasertrabekuloplastik vorgenommen. Beim akuten Glaukomanfall, auch *Winkeblockglaukom* genannt, ist durch Verlegung des Kammerwinkels ein erhöhter Druckgradient entstanden.

In diesem Fall bietet es sich an, die Trennwand, also die Iris, zu durchbohren. Eine solche Operation kann sowohl mit einem thermischen Argonlaser als auch mit einem leistungsstarken Nd:YAG-Laser durchgeführt werden. Entscheidend erleichtert wird die Operation durch das Aufsetzen speziell angefertigter Kontaktgläser [14]. Damit kann man die Energiedichte im Bereich der Iris vervierfachen und im Bereich der Hornhaut um einen entsprechenden Faktor verringern.

Der Nachteil des Argonlasers besteht darin, dass wegen seiner thermischen Wechselwirkung koagulierte Pigmentklumpen entstehen können, die das Loch in der Iris in vielen Fällen wieder verschließen. Aus diesem Grund ist bei Iridotomien dem Nd:YAG-Laser der Vorzug zu geben.

In der Regel lässt sich eine solche Operation mit weniger als 20 Einzelschüssen bei einer Pulsenergie zwischen 1 und 3 mJ durchführen. Als einfache und für den Patienten wenig belastende Operation kann die Nd:YAG-Iridotomie auch ambulant vollzogen werden. Neuere Untersuchungen belegen, dass auch der oben bereits erwähnte Nd:YLF-Laser mit Pikosekundenpulsen für eine solche Operation geeignet ist.

16.2.4 Das Trabekelwerk

Die wichtigste Indikation für eine Laserbehandlung des Trabekelwerks (Lasertrabekuloplastik) ist ein erschwerter Abfluss des Kammerwassers. Mit Hilfe eines Lasers können mehrere kleine Narben im Trabekelwerk generiert werden. Diese Narben öffnen infolge einer Kontraktion des umliegenden Gewebes die verstopften Maschen des Trabekelwerks und können dabei den Abflusswiderstand des Kammerwassers erniedrigen.

Typische Operationen mit einem Argonlaser benötigen ca. 100 Applikationsherde mit einer Fokusgröße von je $50\text{ }\mu\text{m}$ bei einer Expositionszeit von jeweils 0,1 s. Inzwischen liegen Langzeitergebnisse mit bis zu zehn Jahren Beobachtungszeit vor. Vor allem das primärchronische Glaukom spricht bei einem Ausgangsdruck unterhalb von 35 mm Hg gut auf diese Lasertherapie an. Als Nebenwirkungen können vorübergehende Druckanstiege und Irisreizungen auftreten. Die in fast allen Fällen erzielte langfristige Drucksenkung ohne ernsthafte Komplikationen hat diese Methode mittlerweile jedoch zu einer Standardoperation gemacht. Heute wird die Laserapplikation zusätzlich durch spezielle Kontaktgläser erleichtert, die aufgrund ihrer Vergrößerung auch eine Reduktion der notwendigen Energie ermöglichen. Da es im Rahmen der Lasertherapien in der Regel zu einem Zusammenbruch der Blut-Kammerwasser-Schranke kommt, wird die Operation meistens von einer prophylaktischen Pharmakotherapie mit Augentropfen begleitet.

16.2.5 Die Sklera

Laserbehandlungen der Sklera lassen sich in externe und interne Sklerostomien einteilen. Ziel beider Operationstypen ist die Schaffung eines durchge-

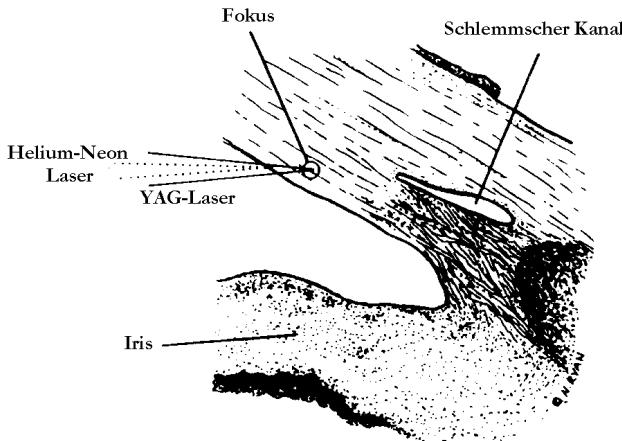


Abb. 16.12. Prinzip der internen Sklerostomie

henden Kanals zum Kammerwinkel, um dort einen Druckausgleich zu ermöglichen. Bei der externen Sklerostomie wird dieser Kanal, von der äußeren Bindehaut (Konjunktiva) beginnend, durch die Sklera gelegt, bis der Kammerwinkel erreicht ist. Diese Operationstechnik ist jedoch meist mit schwerwiegenden Entzündungen der Bindehaut verbunden, die zu ernsthaften Komplikationen führen kann.

Eine elegantere und für den Patienten schonendere Methode ist die interne Sklerostomie: über eine speziell angefertigte Linse lässt sich ein Nd:YAG- oder Nd:YLF-Laserstrahl so durch die Hornhaut in den Kammerwinkel ein-koppeln, dass er, von innen beginnend, einen Kanal bis nach außen ablatieren kann [9]. Voraussetzung hierfür ist eine hinreichend kleine Fokusgröße. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass ein Druckausgleich des Kammerwinkels mit der Flüssigkeit unterhalb der Bindehaut stattfinden kann, ohne dass die Bindehaut durchtrennt wird. Abbildung 16.12 zeigt schematisch, wie der Nd:YAG-Laser von innen auf die Sklera trifft und einen optischen Durchbruch verursacht, ohne die äußere Bindehaut zu verletzen. Fokussiert werden kann mit einem HeNe-Laser, da der Infrarotstrahl des Nd:YAG-Lasers nicht sichtbar ist.

Der Augenarzt kann die Operation durch eine Spaltlampe beobachten. Solche Sklerostomien bilden den letzten Ausweg für Patienten, die an einem Kammerwinkelglaukom leiden und bei denen der Abfluss des Kammerwassers in das venöse Gefäßsystem irreversibel geschädigt ist.

16.2.6 Die Hornhaut

Die Hornhaut des Auges, auch Cornea genannt, ist das einzige transparente Gewebe des menschlichen Körpers. Die Transparenz resultiert aus ihrer extrem regulären mikroskopischen Struktur. Die Dicke der menschlichen Cornea

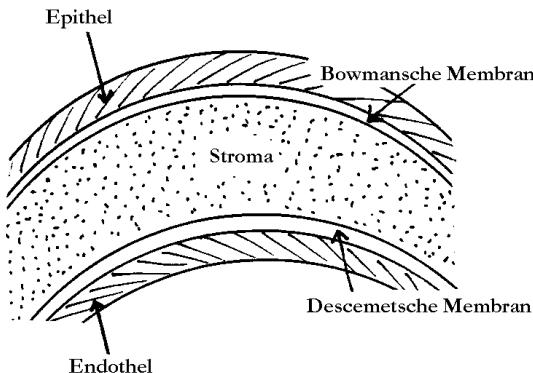


Abb. 16.13. Aufbau der menschlichen Hornhaut

beträgt ungefähr 0,5 mm in der Nähe der optischen Achse und wächst bis auf 0,7 mm in der Nähe der Sklera an. Die optische Zone hat einen Durchmesser von durchschnittlich 4 mm und wird über die Iris kontrolliert. Die Hornhaut besteht aus fünf übereinander liegenden Schichten. Dies sind von außen nach innen die Epithelschicht, die Bowman-Membran, das Stroma, die Descemet-Membran und die Endothelschicht (Abb. 16.13).

Das Epithel besteht aus zwei bis drei Schichten flacher Zellen, welche zusammen mit der Tränenflüssigkeit für eine glatte Oberfläche sorgen. Die hinterste dieser Schichten enthält Basalzellen. Dies sind die einzigen Zellen in der Hornhaut, die sich regenerieren können. Die Tränenflüssigkeit wird mit dem Lidschlag gleichmäßig auf die Oberfläche verteilt. Sie glättet die optische Oberfläche und versorgt dabei gleichzeitig die Zellen mit Nährstoffen. Die Bowman-Membran besteht aus einer dicht gepackten Schicht von Kollagenfasern und ist zusammen mit dem Stroma hauptsächlich für die mechanische Stabilität der Cornea verantwortlich. Neunzig Prozent der Hornhautdicke bildet das Stroma. Es besteht aus ca. 50 Schichten von Kollagenfasern, die etwas dünner gepackt sind als in der Bowman-Membran und alle in parallelen Ebenen zur Oberfläche angeordnet sind. Die Descemet-Membran hat eine ähnliche Struktur wie die Bowman-Membran. Das Endothel schließlich besteht aus zwei Schichten hexagonal angeordneter Zellen. Sie sind notwendig, um die Transparenz der Hornhaut zu gewährleisten. Ihre Zerstörung würde zu einem irreversiblen Einfluss von Kammerwasser führen.

Prinzipiell lassen sich zwei Kategorien von Laseranwendungen an der Hornhaut unterscheiden: Veränderungen ihrer Brechkraft und alle anderen therapeutischen Zwecke. Die erste Kategorie hat sich unter dem Namen *refraktive Hornhautchirurgie* einen festen Platz in der Augenheilkunde verschafft. In die zweite Kategorie lassen sich alle anderen Operationen einordnen, bei denen der Laser das bisherige mechanische Skalpell ersetzt hat. Dazu gehören unter anderem Hornhauttransplantationen und Therapien von deformierten Hornhäuten, z.B. dem Keratokonus, eine pathologische Ausstülp-

pung der Hornhaut nach vorn. Das Gebiet der refraktiven Hornhautchirurgie ist wesentlich umfangreicher und soll im Folgenden ausführlich diskutiert werden.

Die Einzelbrechkräfte der Hornhaut und der nichtakkomodierten Linse betragen 43 bzw. 19 dpt. Die Hornhaut trägt folglich mit gut 70% zur Gesamtbrechkraft des Auges bei. Letztere lässt sich also mit hoher Effizienz variieren, wenn man den vorderen Krümmungsradius der Hornhaut künstlich verändert. Hierfür wurden bereits verschiedene Techniken weltweit untersucht. Die meisten dieser Verfahren erreichen dieses Ziel indirekt, indem verschiedene linienförmige Muster in die periphere Oberfläche der Hornhaut geschnitten werden. Dabei entsteht eine Umverteilung der mechanischen Zugkräfte in der Bowman-Membran und im Stroma, woraus letztendlich der veränderte Krümmungsradius resultiert. Eine dieser Prozeduren wird *radiäre Keratomie* genannt und wurde ursprünglich mit einem Skalpell durchgeführt [6]. Dabei vollzieht man mit einem Skalpell bis zu acht radiale Einschnitte (Inzisionen) in die periphere Cornea. Abbildung 16.14a zeigt vier solcher Schnitte in der Aufsicht und im Querschnitt.

Seit einigen Jahren versucht man, mit Hilfe von Lasern einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Dabei wird allerdings Gewebe entfernt. Man spricht daher terminologisch von Exzisionen und der radiären Keratektomie. Die Vorteile des Lasers liegen auf der Hand: Der Laserstrahl lässt sich wesentlich genauer positionieren als ein mechanisches Skalpell, die Schnitt-Tiefen sind nicht mehr von der ruhigen Hand des Chirurgen abhängig, und es kann ohne mechanischen Kontakt mit dem Auge operiert werden.

Ein anderes Verfahren liegt der photorefraktiven Keratektomie zu Grunde, bei der man eine großflächige Abtragung von Hornhautgewebe anstrebt. Abbildungen 16.14b und 16.14c zeigen schematisch, wie solche Veränderungen für ein myopes (kurzsichtiges) bzw. hyperopes (weitsichtiges) Auge auszusehen haben. Bei der Myopie befindet sich das scharfe Bild vor der Netzhaut. Durch eine Abflachung der Hornhaut kann es auf die Netzhaut projiziert

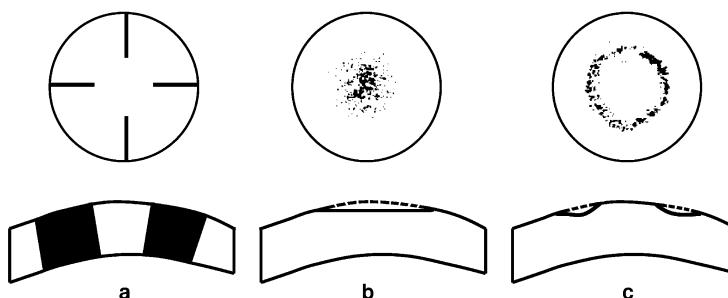


Abb. 16.14. Prinzip der refraktiven Hornhautchirurgie (oben: Aufsicht, unten: Querschnitt). (a) radiäre Keratomie, (b) Keratektomie bei Kurzsichtigkeit, (c) Keratektomie bei Weitsichtigkeit

werden. Bei der Hyperopie kann die Linse nicht stark genug akkomodieren. Dies lässt sich über eine stärkere Hornhautkrümmung kompensieren. Astigmatismen kann man über unterschiedliche Krümmungsradien in der horizontalen bzw. vertikalen Achse ausgleichen. Voraussetzung für alle diese Prozeduren ist, dass die Hornhaut selbst transparent bleibt. Dies ist nicht gegeben, wenn die Laserstrahlung thermische Nebeneffekte (Koagulation, Karbonisation) verursacht oder wenn die neue Oberfläche zu rauh wird und dann eine zu hohe Lichtstreuung hervorruft. Letzteres ist der Fall, wenn die Rauhigkeit der Hornhautoberfläche größer ist als die Wellenlängen des sichtbaren Spektrums.

Am meisten untersucht wird derzeit der ArF-Laser, ein Excimerlaser, der bei einer Wellenlänge von 193 nm emittiert [7, 10]. Der Ablationsvorgang beruht hier auf einem direkten Aufbrechen der molekularen Bindungen, das durch die folgenden zwei Eigenschaften ermöglicht wird:

- die Strahlung dieser Wellenlänge wird von den Kollagenfasern der Hornhaut stark absorbiert,
- ein einzelnes Photon stellt mit einer Energie von 6,4 eV genügend Energie zur Verfügung, um eine molekulare Bindung aufzubrechen.

Eine weitere Möglichkeit bietet möglicherweise der Nd:YLF-Laser (Wellenlänge 1053 nm). Bei ihm liefert jedes Photon nur eine Energie von 1,2 eV. Diese reicht nicht aus, um die molekularen Bindungen aufzubrechen. Eine Multiphotonenabsorption wird durch den geringen Absorptionskoeffizienten des Gewebes bei dieser Wellenlänge unterdrückt. Ein fokussierter, sehr kurzer Laserpuls kann aber über seine extrem hohe Leistungsdichte ($> 10^{12} \text{ W/cm}^2$) so hohe elektrische Felder ($> 10^5 \text{ V/cm}$) erzeugen, dass im Fokus ein Mikroplasma generiert wird. Dieses Plasma hat einen wesentlich höheren Absorptionskoeffizienten als das normale Gewebe und absorbiert daher auch nachfolgende Photonen. Die schnelle Ausdehnung des Plasmas erzeugt eine akustische Schockwelle, die zusammen mit dem Plasma eine Absorption von Gewebefragmenten ermöglicht [12]. In Abb. 16.15 ist die Abhängigkeit des Ablationsschwellenwertes von der Pulsdauer dargestellt.

Sowohl mit dem ArF-Laser als auch mit dem Nd:YLF-Laser wurden bereits Untersuchungen an Patienten durchgeführt. Da der ArF-Laser jedoch schon fünf Jahre länger im klinischen Einsatz ist, liegen von ihm wesentlich mehr Daten vor. Es hat sich gezeigt, dass bei fast allen Patienten eine Überkorrektur notwendig ist, das heißt, dass ein zuvor kurzsichtiger Patient zunächst weitsichtig gemacht werden muss, bevor das Auge eine stabile normalsichtige Mittellage einnimmt. Als weiterer Nachteil hat sich ergeben, dass noch nach einigen Jahren eine mehr oder weniger starke Trübung der Hornhaut einsetzen kann. Dies hängt wahrscheinlich mit dem UV-Licht zusammen, da diese Wellenlänge zytotoxische und mutagene Nebenwirkungen in den Zellen hervorrufen kann. Außerdem wirkt sich die Verletzung der Epithelschicht und der Bowman-Membran als Schmerzempfindung auf den Patienten aus.

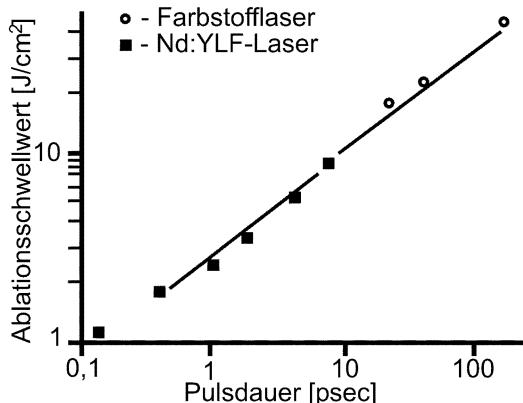


Abb. 16.15. Ablationsschwellenwert des Stromas als Funktion der Pulsdauer

Diese Nachteile könnten umgangen werden, wenn man eine andere Technik einsetzt, die derzeit ein Gebiet der aktuellen Forschung ist: die refraktive Hornhautchirurgie durch intrastromale Ablation. Hierbei bleiben Epithelschicht und Bowman-Membran unverletzt, da der Laserpuls im Bereich des Stroma fokussiert wird und nur dort ablatiert.

Dafür kann natürlich nur ein Laser eingesetzt werden, dessen Strahlung nicht an der Oberfläche der Hornhaut absorbiert wird. Das UV-Licht der Excimerlaser hat aber nur eine Eindringtiefe von wenigen μm . Abgesehen von der Wellenlänge lassen sich Excimerlaser aufgrund ihrer Multimodenstruktur auch gar nicht fokussieren. Excimerlaser scheiden also von vornherein aus. Der Pikosekunden-Nd:YLF-Laser dagegen bietet sich als Alternative an, zumal er durch seine ultrakurzen Pulse einen lokal sehr begrenzten Effekt im Gewebe erwarten lässt. Außerdem weist er als Festkörperlaser den Vorteil auf, dass er leichter zu warten ist und für den Laserbetrieb keine toxischen Fluoridgase verwendet werden müssen. Abbildung 16.16 zeigt eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme einer solchen intrastromalen Ablation [13]. Nach dem Kollaps der erzeugten Kavität ergibt sich eine neue Brechkraft für die vordere Hornhautoberfläche.

16.3 Ausblick

Die dargestellten Anwendungen machen deutlich, dass der Laser aus der Augenheilkunde nicht mehr wegzudenken ist. Sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie hat er sich einen festen Platz verschafft. Es versteht sich von selbst, dass je nach Anwendung ein anderer Lasertyp sinnvoll sein kann. Über die Pulsdauer kann die Art der Wechselwirkung festgelegt werden. Eine gezielte lokale Begrenzung des Effekts kann aufgrund von Fokussierung und Wellenlängenselektion erfolgen. Viele dieser Operationen sind erst mit Hilfe des Laser möglich geworden. In den nächsten Jahren werden zu den bereits

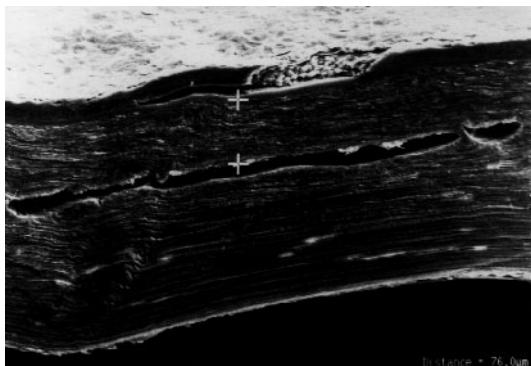


Abb. 16.16. Rasterelektronenmikroskopaufnahme einer intrastromalen Ablation. Der Abstand der Kreuze beträgt 76 μm

bestehenden Einsatzmöglichkeiten noch weitere hinzukommen. Schon heute zeichnet sich aber ab, dass alle diese chirurgischen Laseroperationen in das Gebeit der „minimal-invasiven Chirurgie“ eingeordnet werden können. Dieses in der Fachliteratur oft zitierte Konzept verfolgt das Ziel, mit möglichst wenig Eingriffen eine geeignete Therapie durchzuführen. Der Laserstrahl bietet hierbei viele neue Möglichkeiten, da er ohne mechanischen Kontakt mit dem Gewebe schneiden, ablatieren und koagulieren kann. Viele Schnitte mit dem Skalpell lassen sich dadurch vermeiden. Die Optimierung der bestehenden und die Erforschung neuer Lasersysteme (z.B. im Femtosekundenbereich) werden dieser minimal-invasiven Behandlungsmethode in den nächsten Jahren viele neue Türen öffnen.

Literatur

1. Aron-Rosa D, Aron JJ, Griesemann U, Thyzel R (1980) Am Intraocular Implant Soc J 6:352–354
2. Beckman H, Sugar HS (1973) Arch Ophthalmol 90:453
3. Bille JF, Dreher AW, Weinreb RN (1989) Appl Optics 28:804
4. Bille JF, Dreher AW, Zinser G (1990) Scanning laser tomography of the living human eye. In: Masters BD (ed) Noninvasive diagnostic techniques in ophthalmology. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, p. 528–547
5. Boulnois JL (1986) Lasers in Med Sci 1:47
6. Fjodorov SN, Durnev VV (1979) Ann Ophthalmol 11:1885
7. Hanna KD (1988) Arch Ophthalmol 106:245
8. L'Esperance FA (1968) Trans Am Ophthalmol Soc 66:827
9. March WF, Gherezghiher T, Koss MC, Nordquist RE (1984) Arch Ophthalmol 102:1834
10. Marshall J, Trakel S, Rothery S, Schubert H (1985) Ophthalmology 92:749
11. Meyer-Schwickerath G (1949) Verhandl deutschen Ophthalmol Ges 55:256
12. Niemz MH, Klancnik EG, Bille JF (1991) Lasers Surg and Med 11:426

13. Niemz MH, Hoppeler TP, Juhasz T, Bill JF (1993) Lasers Light Ophthalmol 5:149–154
14. Roussel R, Fankhauser F (1983) Int Ophthalmol 6:183
15. Weinreb RN, Dreher AW, Bille JF (1989) Int J Ophthalmol 13:235

17 Laseranwendung in der Ortopädie

C. Rumpf

17.1 Einführung

Im Rahmen der Bemühungen von Kliniken und Ärzten zur Reduzierung der Kosten des Gesundheitswesens müssen neue Operationstechniken entwickelt werden, die eine wirkungsvolle Behandlung mit kurzen Operationszeiten und rascher Mobilisierung des Patienten ermöglichen, um insbesondere den Bedarf an intensiver Nachbehandlung zu minimieren.

Ein möglicher Weg zur Verwirklichung dieses Ziels ist der Einsatz minimal-invasiver Operationstechniken, die – im Gegensatz zu konventionellen Methoden – nicht nur zu einer schnelleren Mobilisierung der Patienten und damit kürzeren Verweilzeiten, sondern auch zu besseren kosmetischen Ergebnissen und geringeren Schmerzen beitragen. Obwohl bereits zahlreiche endoskopische Verfahren seit einigen Jahren eingesetzt werden, ist die thorakoskopische Chirurgie der Wirbelsäule eine relativ neue Operationstechnik, die bisherige offene Techniken ersetzt [17].

Mit der technischen Weiterentwicklung hinsichtlich Zuverlässigkeit und Größe wie auch der Entwicklung von neuen Applikatoren wie Lichtleitfasern, Spiegelarmsystemen oder endoskopischen Systemen, hat die Anzahl klinischer Laseranwendungen in den vergangenen Jahren stark zugenommen. Durch das Zusammenbringen dieser beiden Aspekte, d.h. durch Kombination endoskopischer chirurgischer Techniken und Hochtechnologielaseranwendungen, sind neue wirkungsvolle klinische Anwendungen möglich geworden. Basierend auf Laser-Gewebe-Wechselwirkungen werden in dieser Arbeit zwei vollständig neue Anwendungen minimal-invasiver Behandlungen in der Orthopädie zur Korrektur spinaler Deformationen und zur Zerstörung von Knochentumoren vorgestellt.

17.2 Minimal-invasive Behandlung von Deformierungen der Wirbelsäule durch Laserablation

Ein bis 3% junger Menschen entwickeln eine starke seitliche Verkrümmung der Wirbelsäule (überwiegend linksseits), eine sog. *idiopathische Skoliose*. Die schwerwiegenden Verformungen beeinflussen nicht nur das Aussehen des Patienten, sondern verringern die Lebenserwartung, da lebenswichtigen Funktionen wie die des Herzens und der Lunge stark beeinträchtigt werden.

Hippokrates (460 v.Chr.) war der erste, der umfangreich über Wirbelsäulendeformationen schrieb und dabei verschiedene Formen und Typen unterschied. Er bemerkte, dass die Schwere der Deformation mit dem Alter, bei dem sie auftrat, zusammenhing. Außerdem erfand er auch die erste Behandlungsmethode, indem er den Körper entlang der Körperachse mechanisch streckte. Heute konzentrieren sich die meisten chirurgischen Behandlungsmethoden von Wirbelsäulendeformationen auf invasive mechanische Techniken mit langen Operationszeiten und starken Auswirkungen auf die Beweglichkeit des Patienten. In den meisten Fällen wird ein rückwärtiger (dorsaler) Ansatz gewählt, um eine feste Arthrodese durch Einsetzen von Stäben in die Wirbelkörper zu erreichen. Diese Stäbe werden dann mit Schrauben entlang der Wirbelsäule fixiert, um mechanische Kraft auf die Wirbelkörper auszuüben und dadurch die Wirbelsäule aufzurichten.

Im Unterschied zu existierenden Behandlungsverfahren ist es das Ziel der vorgestellten Methode, die Patienten mittels Laserablation des epiphysialen Knorpels der Wirbelkörper zu behandeln. Es ist bekannt, dass eine frühzeitige partielle Ablation der epiphysialen Wachstumsplatte (Hemiepiphysiodese) über den Bereich mehrerer Wirbelkörper skoliosisches Wachstum verursachen kann [4, 7, 11, 28, 32]. Die vorgestellte Laserbehandlung soll nun zeigen, dass damit eine Veränderung des Wirbelsäulenwachstums induziert werden kann. Wenn es gelingt, mittels Laserhemiepiphysiodese skoliotisches Wachstum zu induzieren, dann ist im Umkehrschluss durch Laserablation auf der konvexen Seite im Bereich mehrerer Wirbelkörper in jungen skoliotischen Patienten mit hinreichendem Wachstumspotential eine Aufrichtung der Wirbelsäule zu erwarten.

17.2.1 Physikalische Eigenschaften von Knochengewebe

Die Kenntnis der physikalischen Eigenschaften von Knochengewebe wie z.B. Wärmeleitfähigkeit, Wärmekapazität und Absorptionskoeffizient sind von wesentlicher Bedeutung für die Berechnung der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen. Obwohl Knochengewebe keine homogene Struktur besitzt, können physikalische Eigenschaften als Mittelwerte für makroskopisch unterschiedliche Komponenten von kompaktem, kortikalem Knochen und schwammförmigem, spongiösem Knochen angegeben werden. Allerdings ergeben sich wesentliche Unterschiede zwischen In-vitro- und In-vivo-Experimenten.

Der Wasseranteil des Gewebes ist der wichtigste Parameter für die thermische Laser-Gewebe-Wechselwirkung, insbesondere im infraroten Spektralbereich. Je größer der Wasseranteil ist, um so stärker ist die Lichtabsorption, wie man aus den Experimenten mit dem Ho:YAG-Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 2,12 \mu\text{m}$ sehen kann. Knorpelgewebe hat einen hohen Wasseranteil von etwa 55–85% und absorbiert deshalb Ho:YAG-Laserlicht sehr stark. Daraus ergibt sich eine effektive Abtragung.

Im Gegensatz dazu enthält kortikales Knochengewebe nur einen Wasseranteil von 10–15%. Deshalb kann eine effektive Laserabtragung von Knochen-

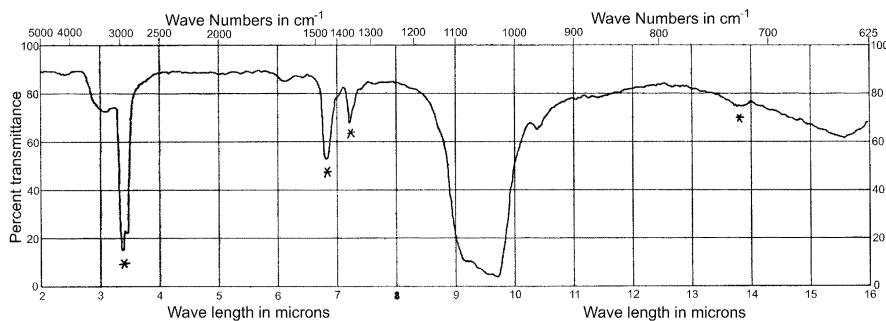


Abb. 17.1. Absorptionsspektrum von Kalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), das 80% des Knochenminerals darstellt [21]

gewebe nur mit Lasern erreicht werden, deren Emissionswellenlänge mit den Absorptionslinien von Knochengewebe übereinstimmen. Der Absorptionskoeffizient μ_a von reinem Hydroxylapatit beträgt bei den Wellenlängen des CO_2 -Lasers ($\lambda = 9,6 \mu\text{m}$ und $10,6 \mu\text{m}$) zwischen 3500 – 5500 cm^{-1} [25]. Da die organische Matrix von Hydroxylapatit hauptsächlich aus Kalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) besteht [24], kann der Absorptionskoeffizient für den Ho:YAG-Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 2,12 \mu\text{m}$ zu $\mu_a \approx 500 \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden, entsprechend dem Absorptionsspektrum in Abb. 17.1. Der Absorptionskoeffizient ist ungefähr 7-mal größer als für H_2O . Deshalb absorbiert die Knochenmatrix den Großteil der Laserenergie und heizt sich sehr stark auf ($T_{\text{melt}} = 1280^\circ\text{C}$). Mittels bekannter thermischer und optischer Konstanten kann die thermische Relaxationszeit τ von kortikalem Knochen bei einer Wellenlänge von $2,12 \mu\text{m}$ zu $\approx 1,2 \text{ ms}$ bestimmt werden [8].

Tabelle 17.1 zeigt einen Vergleich der optischen und thermischen Parameter von kortikalem und spongiösem Knochen, Knorpelgewebe und Wasser.

Tabelle 17.1. Vergleich der optischen und thermischen Parameter von kortikalem und spongiösem Knochen, Knorpel und Wasser

	kortikale Knochen	trabekulare Knochen	Knorpel	Wasser
$\mu_a [\text{cm}^{-1}]$	≈ 500 ($\lambda = 2,120 \mu\text{m}$) s. Abb. 17.1		1200 ($\lambda = 1,06 \mu\text{m}$)	
$\lambda [\text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}]$	0,2–0,3	0,3–0,4	0,6	0,7
$c [\text{Jg}^{-1}\text{K}^{-1}]$	1,2–1,3	1,2–2,4	3,5–3,8	4,18
$\rho [\text{gcm}^{-3}]$	2	1,1	1,1	1
$\chi [\text{m}^2\text{s}^{-1}]$	$0,8 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$
$\tau [\mu\text{s}]$	≈ 400 – $800 \mu\text{s}$ ($\lambda = 2,12 \mu\text{m}$)			

17.2.2 Minimal-invasive Skoliosebehandlung mit dem Ho:YAG-Laser

Es wird angenommen, dass nur eine vollständige Zerstörung der „Wachstumsplatte“ (Epiphyse) ausreicht um das Wirbelsäulenwachstum zu beeinflussen. Die Abtragung muss dabei sehr präzise sein, da die Epiphyse nur ca. 1 mm breit ist und thermale Schädigungen der benachbarten Strukturen minimiert werden müssen. Insbesondere darf die Hitzebelastung des Rückenmarks 42°C nicht überschreiten.

Nach einer Beurteilung von vier verschiedenen Lasersystemen während umfangreicher In-vitro-Studien an Lämmerwirbelsäulen erwies sich der Ho:YAG-Laser aufgrund seiner Wellenlänge als am besten geeignet für die präzise Ablation des Epiphysengewebes. Das Lasersystem ist für den klinischen Gebrauch entwickelt mit einem kompakten beweglichen Gehäuse und einem geschlossenen Kühlungssystem, was es zu einem autonomen „Turn-key“-System macht.

Das Lasermedium besteht aus einem mit Holmium dotierten Ytterbium-Aluminium-Granatkristall ($\text{Yb}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) mit Dotierungsraten von 10^{19} – 10^{22} cm^{-3} . Besetzungsinversion wird durch die Absorption des Cr^{3+} in das metastabile Niveau $^3\text{F}_4$ erreicht und das obere $^3\text{H}_4$ -Niveau des Tm^{3+} -Ions wird durch einen emissionslosen Übergang besetzt. Laserstrahlung der Wellenlänge $\lambda = 2120 \text{ nm}$ wird emittiert beim Übergang vom $^5\text{I}_7$ -Level zum $^5\text{I}_8$ -Niveau (Abb. 17.2).

Der Bereich der thermischen Beschädigung auf Grund von Karbonisation durch den Ho:YAG-Laser variiert zwischen den verschiedenen Gewebearten entsprechend ihrem Wassergehalt. Für Knorpelgewebe mit einem Wassergehalt von ca. 70% wird die Abtragung bestimmt durch die Absorption des Lichts durch die Wassermoleküle $\alpha_{\text{H}_2\text{O}} \approx 50 \text{ cm}^{-1}$ bei 2120 nm. So führen

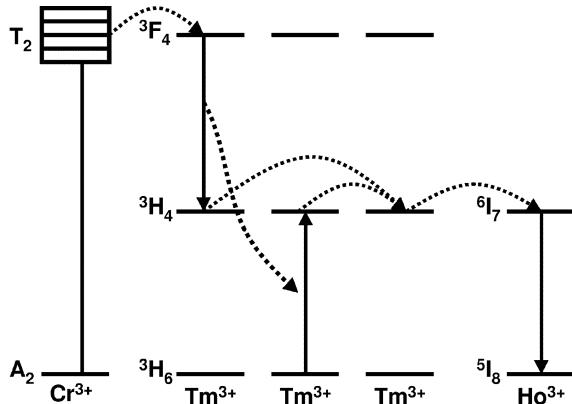


Abb. 17.2. Energieniveauphysik eines Ho:YAG-Lasers. Das obere $^3\text{H}_4$ -Niveau des Tm^{3+} -Ions wird durch einen strahlungsfreien Übergang besetzt. Laserstrahlung wird beim Übergang vom $^5\text{I}_7$ -Niveau zum $^5\text{I}_8$ -Niveau emittiert ($\lambda = 2120 \text{ nm}$)

wegen der hohen Pulsenegie von bis zu 1800 mJ schon die ersten Pulse zu einem großen Energieeintrag in ein kleines Gewebevolumen (thermale Durchdringungstiefe ca. 250 µm). Die Energie wird durch Vibrations- und Rotationszustände der Wassermoleküle in Wärme umgewandelt. Dies führt zu einer schlagartigen Verdampfung des Wassers innerhalb des Gewebes, was in Mikroexplosionen resultiert, die Gewebefragmente mit hoher kinetischer Energie herausschleudern und dadurch einen großen Teil der Pulsenegie wegtragen. Nachdem das ganze Wasser im Fokusvolumen verdampft ist, führen nachfolgende Pulse zu einer rapiden Erwärmung des Gewebes. Das selbe passiert in einem Gewebe mit niedrigem Wassergehalt, wie etwa kortikalem Knochen. Die hohen Temperaturen führen zu einer Verkohlung der Gewebeoberfläche innerhalb eines Bereichs von ca. 50 µm [33], was in einer noch verstärkten Lichtabsorption und damit einer beschleunigten Erwärmung des Gewebes resultiert. Die Temperatur innerhalb des thermalen Volumens kann innerhalb von ein paar µs auf mehrere tausend °C steigen, und somit ein thermisches Plasma zünden [15, 19]. Dieser Vorgang wird von den typischen Geräuschen und intensivem Fluoreszenslicht begleitet. Indem man die Gewebeoberfläche mit einem dünnen Wasserfilm bedeckt hält, z.B. durch Spülung, kann der gesamte laterale thermische Schaden auf 100–200 µm begrenzt werden.

Videogestützte thorakoskopische Wirbelsäulenchirurgie. Zur Sichtkontrolle während der Operation wurde ein 3D-thorakoskopisches System für minimal-invasive Operationen benutzt (R. Wolf, Deutschland). Die Videosignale der CCD-Kamera des Endoscops (Abb. 17.3) mit zwei Objektivlinsen am fernen Ende (rechtes Bild in Abb. 17.4) ist über einen Videosignalprozessor mit einem 100-Hz-Monitor verbunden. Der Prozessor sendet abwechselnd Bilder vom linken und rechten Kanal. Durch das Tragen einer speziellen Shutterbrille (Abb. 17.5), die mit der Monitorfrequenz synchronisiert ist, erhält der Chirurg ein dreidimensionales Bild des Operationsfeldes.

Für lange Operationen ist ein sog. *head-mounted display* (HMD) eine gute Alternative. Das linke Bild in Abb. 17.4 zeigt ein HMD, bei dem die Displays in einem helmartigen System untergebracht sind. Das Videosignal wird an ein LCD vor jedem Auge gesendet.

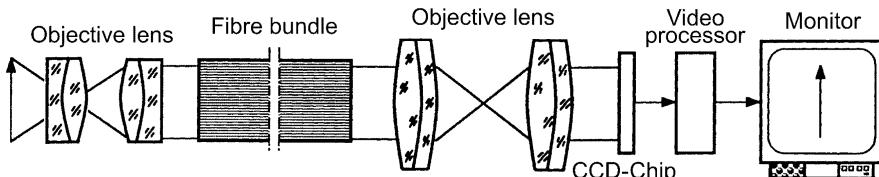


Abb. 17.3. Komponenten eines typischen endoskopischen Systems

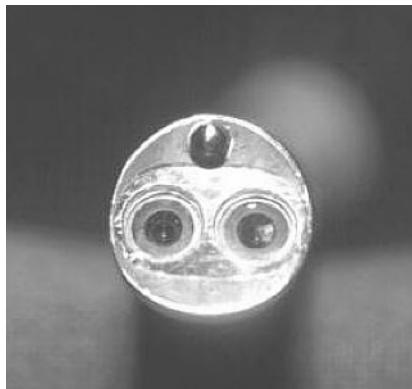


Abb. 17.4. Rechts: Fernes Ende eines 3D-Thoracoskops mit zwei Objektivlinsen und einem Spülkanal. Links: am Kopf des Operateurs angebrachtes (*head-mounted*) Flüssigkristalldisplay (LCD) für endoskopische Operationen (1). Das Mikrofon (2) kann dazu genutzt werden, jede Art von Bildern zu laden, z.B. Röntgen-, CT- oder MRT-Bilder

Sorgfältige Auswertung von voroperativen MRT-Aufnahmen ist wichtig für die Plazierung der Kanüle und zur Reduzierung der Zeit, die notwendig ist, um das Gebiet der Wirbelsäulenerkrankung zu lokalisieren.

In-vivo-Untersuchungen. Nachdem ein Tierarzt konsultiert wurde, entschieden wir uns dafür, Foxhound Welpen für die In-vivo-Untersuchungen zu benutzen. Foxhounds wurden als geeignet angesehen, da sie eine Narkose ohne Probleme während langer Operationszeiten ertragen können und weil die Größe ihres Thorax vergleichbar mit der junger Patienten ist. Alle Experimente wurden in einer für Tieroperationen besonders ausgerüsteten Sektion der Orthopädischen Klinik Heidelberg ausgeführt.



Abb. 17.5. Minimal-invasive Laserhemiephysiodesis an jungen Foxhoundwelpen durch Benutzung eines 3D-Thorakoskops. Der Operateur trägt eine Shutterbrille (1) für eine 3D-Ansicht des Operationsfeldes. Er hält die 3D-thorakoskopische Kamera (5) in einer Hand und die endoskopische Pinzette oder den Laserapplikator (3) in der anderen. Der Assistent hält die Saug- und Spülseinheit (4) und den Lungenretraktor (2)

Experimentelles chirurgisches Vorgehen. Üblicherweise wird der erste Eingriff in den Brustkorb im sechsten interkostalen Zwischenraum in der mittigen bis posterioren axillaren Linie durch einen kleinen Schnitt in der Haut erreicht. Die Ventilation zur betroffenen Seite wird unterbrochen, und die Lunge kollabiert. Die kollabierte Lunge stellt dem Operateur genügend Raum für einen thorakoskopischen Eingriff zur Verfügung. Vier bis fünf weitere Kanülen (10 mm Durchmesser) wurden dann derart platziert, dass das 3D-Endoskop, der Lungenretraktor, die Spülung und Absaugung sowie der Laserapplikator eingeführt werden konnten und so eine vollständige Manipulation und Beurteilung der gesamten thorakischen Wirbelsäule möglich war. Nur wenige Narben von etwa 2 cm Länge werden nach der Operation verbleiben, was ein wesentlicher Vorteil im Vergleich mit üblichen dorsalen Fixationstechniken ist.

Nach der Preservation des vertebraLEN Körpers wurde die Laserfaser in eine sterile Schutzabdeckung eingeführt. Ein spezieller Faserapplikator wurde entwickelt, um das distale Ende der Faser gegen mechanische Belastung zu schützen, und um eine sichere und einfache Handhabung durch den Opera-

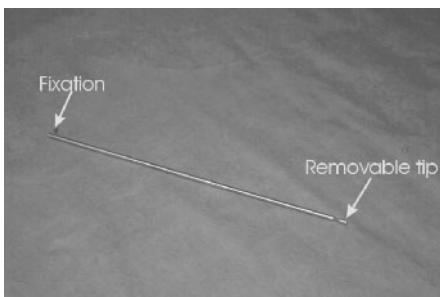


Abb. 17.6. Faserapplikator für Laserhemiepiphysiodesis. Die Spalte zeigt einen hohlen Stahlrohrapplikator mit einer abnehmbaren Spitze (removable tip). Eine Schraube fixiert die Faser an der Spitze. Pfeile markieren die 'Fixation' und die 'Removable tip'.

teur zu ermöglichen. Wie in Abb. 17.6 gezeigt, besteht der Applikator aus einem hohlen Rohr (rostfreier Stahl, 4 mm Außendurchmesser) mit einer entfernabaren Spitze zur einfachen Einführung der Faser. Nachdem der Operateur die gewünschte Ablationstiefe aus den MR-Aufnahmen bestimmt hat, wird die Faser mit einer Schraube so fixiert, dass sie um die gewünschte Länge aus dem Applikator herausragt.

Die hier verwendete Ablationstechnik entspricht der bei In-vitro-Untersuchungen entwickelten Technik. Die Faserspitze wurde zunächst entlang der Oberfläche der epiphysealen Platte geführt, wobei der Laser mit kurzen Pulsen betrieben wurde, um nur wenig Gewebeabtrag zu erzielen. Dadurch produzierte der Operateur eine kleine Spur von ablatiertem Gewebe, die als Markierung für die epiphyseale Wachstumsplatte diente und eine gute Orientierung ermöglichte, ohne Blutungen von den vetebralen Körpern zu verursachen. Der Operateur führte dann die Hemiepiphysiodesis entlang dieser Spur aus. Es wurden längere Lasersequenzen von etwa 20–30 s mit Pulsenenergien bei 0,8–1 J und einer Repetitionsraten von 8 Hz appliziert. Dies entspricht einer mittleren Leistung von 6–8 W.

In zwei Fällen erlaubte der relativ kleine kraniale Teil des Thorax nur die Behandlung von 3–4 epiphysealen Wachstumsplatten. In allen anderen Fällen konnten 5–6 epiphyseale Wachstumsplatten entfernt werden. Insgesamt wurden 8 Foxhounds mit der Laserhemiepiphysiodesistechnik behandelt. Ein fluoroptisches Faserthermometer wurde anstelle von Halbleitersensoren für die In-vivo-Temperaturkontrolle während der Laserbehandlung verwendet (Abb. 17.7). Nach der Operation wurden die Tiere extubiert und verblieben für mindestens 2 h unter tierärztlicher Aufsicht in einer Hundehütte innerhalb des Operationsgebäudes. Sie wurde dann zum Züchter zurückgebracht, wo sie mit anderen Tieren weiter aufwuchsen. Ihre Gesundheit und ihr Wohlergehen wurde regelmäßig überprüft. Nach 6 Monaten wurden die Foxhounds geröntgt, um festzustellen ob sie bereits skoliotisches Wachstum zeigten. In fast allen Fällen konnte zu dieser Zeit nur eine geringfügige Wirbelsäulenverkrümmung festgestellt werden.

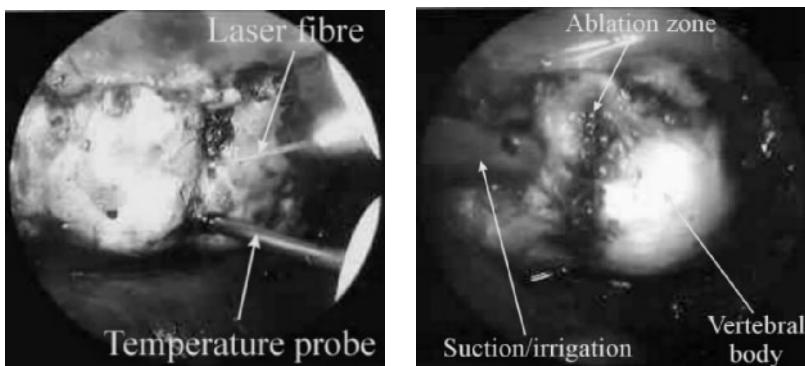


Abb. 17.7. Videoscans einer Laserhemiepiphiodesis mit einem thorakoskopischen Zugang. *Links:* Laserapplikator und faseroptische Temperatursonde innerhalb des vertebraalen Körpers. *Rechts:* Saug-/Spülseinheit und die epiphyseale Platte nach Laserhemiepiphiodesis

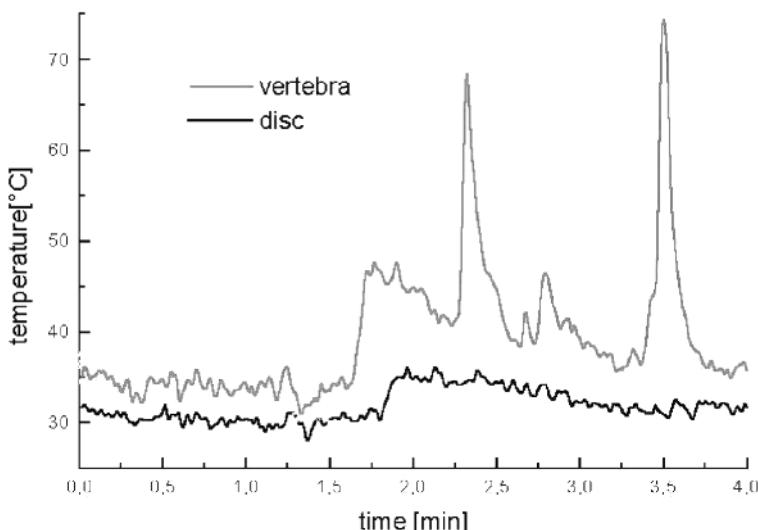


Abb. 17.8. Temperatur innerhalb des Wirbelkörpers und der angrenzenden Bandscheibe während der In-vivo-Ho:YAG-Laserablation. Die Entfernung zwischen dem Temperatursensor und der Faserspitze beträgt etwa 2 mm

Die Foxhounds waren 1 Jahr nach der Operation vollständig ausgewachsen. Eine abschließende Kontrolle wurde deshalb mit Röntgen- und MRT-Untersuchungen durchgeführt. Nach den Untersuchungen wurden die Foxhounds eingeschläfert und ihre Wirbelsäulen für zusätzliche histologische Untersuchungen und Kryomikrotomschnitte präpariert.

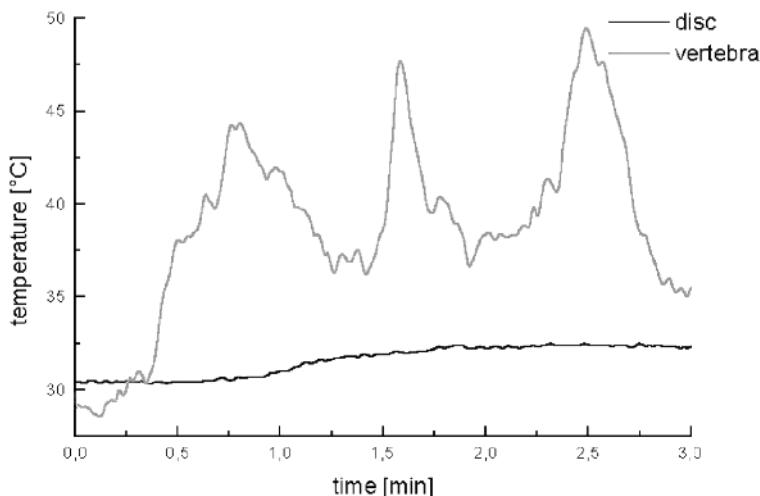


Abb. 17.9. Temperatur innerhalb des Wirbelkörpers und der angrenzenden Bandscheibe während der In-vivo-Ho:YAG-Laserablation. Die Entfernung zwischen dem Temperatursensor und der Faserspitze beträgt etwa 4 mm

Temperaturmessungen. Die Ergebnisse der Temperaturmessungen hingen stark von der Position der Probe ab, sodass ein direkter Vergleich der Temperaturen zwischen den verschiedenen Messungen nicht möglich war. Zwei typische Kurven der Temperaturemessungen während der Operation finden sich in Abb. 17.8 und 17.9.

Kryomikrotom und histologische Untersuchungen. Die postoperative Untersuchung mit dem Kryomikrotom, die sich in den In-vitro-Experimenten bereits als sehr nützlich erwiesen hatte, wurde auch für In-vivo-Untersuchungen durchgeführt. Nach Dissektion wurden die Wirbelsäulenabschnitte in der Koronalebene geschnitten, um Abweichungen vom skoliotischen Wachstum zu zeigen. Veränderungen im vertebralem Wachstum durch die Laserbehandlung sind deutlich sichtbar (Pfeile).

Endergebnisse. Während extensiver In-vivo-Experimente hat sich der Ho:YAG-Laser als ein geeignetes Werkzeug für die genaue, schnelle und effektive Ablation von Knorpelgewebe erwiesen und ermöglicht so eine neue sanfte Operationstechnik für die Behandlung von idiopathischen Skoliosen.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Wirbelkörper, die mit dem Ho:YAG-Laser behandelt wurden, abnormales Wachstum entwickelten. In 75% der Fälle konnte der gewünschte Effekt einer unilateralen Wachstumshemmung auf der Seite der Laserhemiepipophysiodese erreicht werden (Abb. 17.10). Die Krümmungsstärke überschritt 30° jedoch nicht und kann deshalb möglicher-

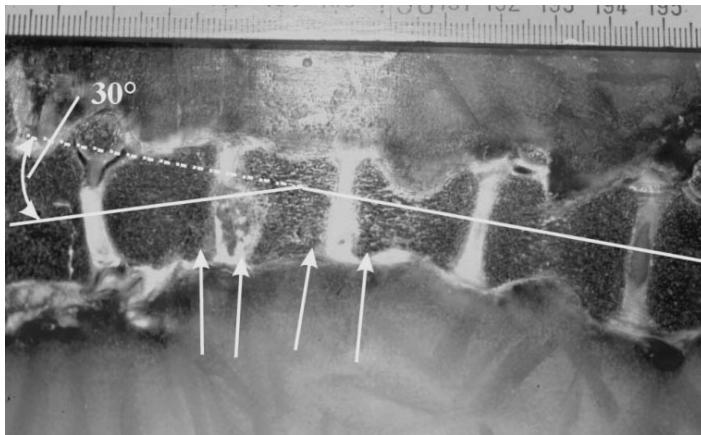


Abb. 17.10. Koronale Kryomikrotomschnitte der Wirbelsäule ein Jahr nach der Laserbehandlung. Eine skoliotische Veränderung des Wirbelsäulenwachstums von 30° ist induziert worden. Veränderungen im vertebralem Wachstum durch die Laserbehandlung sind deutlich sichtbar (*Pfeile*)

weise zu gering sein, um schwerwiegendes skoliotisches Wachstum zu kompensieren.

Die gewählte 3D-thorakoskopische Operationstechnik in Kombination mit dem Ho:YAG-Laser hat sich als erfolgreich und zuverlässig im Hinblick auf Lasergewebeablation, Laserhandhabung und Sicherheit in empfindlichen Strukturen erwiesen. Alternative Laserablation kann in der Zukunft durch neu entwickelte optische Saphirfasern möglich werden, die bei Wellenlängen von bis zu $3,5\text{ }\mu\text{m}$ hohe Transmissionsraten von mehr als 80% erreichen. Dies würde die endoskopische Verwendung von Erbium dotierten Lasern bei Wellenlängen um $3\text{ }\mu\text{m}$ erlauben, bei denen Wasser sein stärkstes Absorptionsmaximum besitzt. Um diese Operationstechnik zu einer klinische Anwendung weiterzuentwickeln ist es notwendig, eine enge Korrelation zwischen der Anzahl der ablatierten Epiphysenfugen und dem Ausmaß des skoliotischen Wachstums zu bestimmen.

17.3 LITT von Knochentumoren unter MRT-Temperaturkontrolle

Ein anderes schnell wachsendes Feld klinischer Laseranwendungen ist die minimal-invasive Behandlung von Tumoren.

Im zweiten Teil werden erste Experimente bezüglich einer klinischen Anwendung mittels einer neuen minimal-invasiven Laserbehandlung gutartiger Knochentumoren beschrieben. Zum ersten Mal wurden dabei die Online-Temperaturmessungen mittels MRI-Bildkontrolle für laserinduzierte interstitielle Termotherapie (LITT) von Knochengewebe angewendet.



Abb. 17.11. Röntgenaufnahme eines 19-jährigen Mannes. Die *Pfeile* markieren das OO des Schienbeins. Der Nidus ist klar abgegrenzt [9]

Es gibt mehrere Arten von Knochentumoren, wobei das Osteoid-Osteom (OO) der am häufigsten auftretende gutartige Tumor ist. Er besteht aus einem Kern (Nidus) und einem Saum. Der Nidus ist weich und reichhaltig von Nervenfasern durchzogen, wodurch starke Schmerzen hervorgerufen werden, die oftmals fälschlicherweise für neurotische Beschwerden gehalten werden und somit zu einer Verzögerung der Diagnose von einigen Monaten bis Jahren führen können [26]. Etwa 70% der Patienten sind jünger als 20 Jahre, und mehr als 80% der Fälle treten in langen Knochen auf: Femur (34%), Tibia (23%), Humerus (6%) und Talus (5%).

Das OO stellt lässt sich aufgrund seiner starken Vaskularisierung auf Röntgen- oder MRT-Aufnahmen gut darstellen. Abbildung 17.11 zeigt eine Röntgenaufnahme eines OO in der Tibia. Der Nidus ist klar abgegrenzt (Pfeil). Abbildung 17.12 zeigt die MR-Aufnahme eines transversalschnitts durch die Tibia. Das OO (Pfeil) ist als eine hyperintense Region innerhalb des sonst dunklen kortikalen Knochens sichtbar [13].

Ziel der vorgeschlagenen Behandlung ist es, Osteoid Osteome durch Laserkoagulation zu zerstören. Dazu wurden drei unterschiedliche Lasersysteme (Nd:YAG, Ho:YAG, kompakter Dioidenlaser $\lambda = 940\text{ nm}$) bezüglich ihrer Anwendbarkeit untersucht. Mittels neuester MRT-Sequenzen zur schnellen

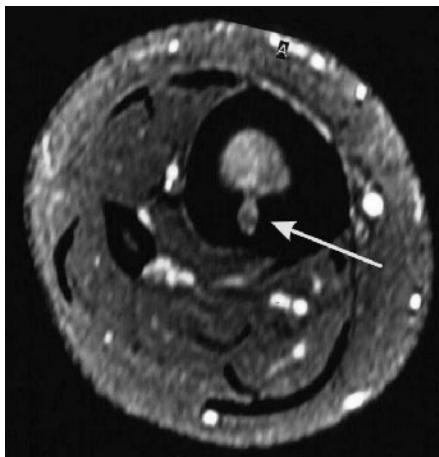


Abb. 17.12. *T*₁-gewichtete MR-Aufnahme eines 22-jährigen Mannes nach Kontrastmittelgabe. Die *Pfeile* markieren das OO des Schienbeins

Online-Temperaturmessung konnte die minial-invasive Laserbehandlung und der Koagulationsprozess kontrolliert werden.

17.3.1 Experimenteller Aufbau

Um die Punktierung des Nidus zu vereinfachen und die präzise Faserplatzierung zu gewährleisten wurde ein neues, MR-kompatibles Punktionsystem entwickelt (Abb. 17.13). Der äußere Ring ermöglicht Punktierungen in der transversalen Ebene in 5-Grad-Schritten. Für die In-vitro-Untersuchungen wurden Schaftoberschenkelknochen benutzt.

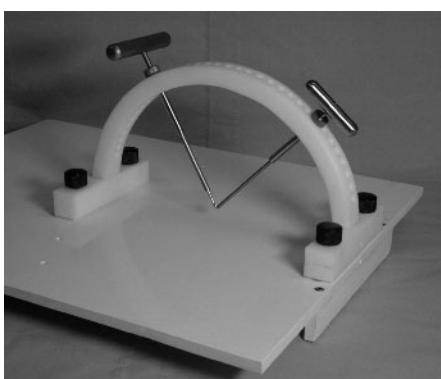


Abb. 17.13. Punktionsystem. Der Ring ermöglicht die präzise Führung der Punktionsnadel in der transversalen Ebene in Schritten von 5°

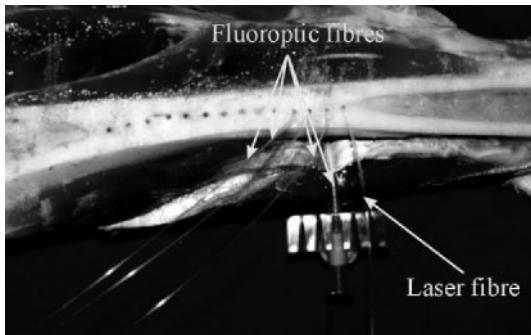


Abb. 17.14. Experimenteller Aufbau zur der Knochenkoagulation mit dem Ho:YAG-Laser

Mit Hilfe eines pneumatischen Bohrers wurden 2–3 Löcher (2,1 mm Durchmesser) in die kortikale Substanz des Oberschenkelknochens gebohrt. Diese Löcher wurden dann mit spongiösem Knochen vom Kopf des Femur gefüllt und somit ein künstlicher Nidus geschaffen. Löcher für die fluoroptische Temperatursonde wurden rechtwinklig zum künstlichen Tumor gebohrt, sodass das distale Ende der Sonde wenige mm vom Tumor entfernt plaziert werden konnte. Die Gewebeprobe wurde dann auf dem MR-Tisch fixiert und der Nidus mit Hilfe einer Handspule präzise lokalisiert.

Der erste Laser, der für Knochenkoagulation ausgewählt wurde, war der Ho:YAG-Laser ($\lambda = 2120$ nm), der auch für die Laserhemiepiphyseose benutzt wurde (s. Kap. 17.2). Abbildung 17.14 zeigt den experimentellen Aufbau. Die Laserfaser wurde in die erste Bohrung 3–4 mm innerhalb des kortikalen Knochens eingeführt. Fiberoptische Prüfspitzen wurden in den Bohrungen in Abständen von 5, 10 und 15 mm angebracht. Der Laser wurde dann für 60 s eingeschaltet und die Temperaturverteilung mit einem fluoroptischen Faserthermometer gemessen. Angefangen mit einer Impulsenergie von 500 mJ und einer Wiederholrate von 10 Hz, wurde die Pulsenergie in Schritten von 500 mJ bis zu einer maximalen Energie von 1500 mJ erhöht. Um den Einfluss der Pulsfrequenz herauszufinden, wurde die Behandlung auch mit gleicher Pulsenergie und Wiederholraten von 5 Hz durchgeführt.

Wie in Abb. 17.15 zu sehen ist, übersteigt die Temperatur sogar bei einer maximalen Pulsenergie von 1500 mJ 70°C innerhalb einer Region von ungefähr 1 cm im Durchmesser nicht. Niedrigere Wiederholraten von 5 Hz zeigten nur kleine Unterschiede. Tabelle 17.2 ist gibt einen Überblick über die Temperaturen, die innerhalb des kortikalen Knochens erreicht wurden.

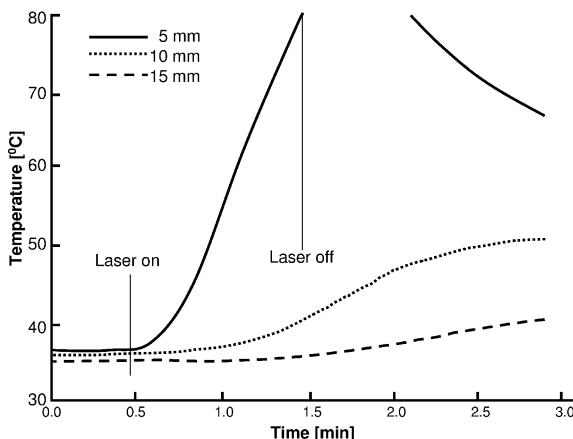


Abb. 17.15. Temperaturverteilung während der Laserkoagulation des kortikalen Knochens mit dem Ho:YAG-Laser. Die Pulsennergie betrug 1000 mJ bei einer Pulsfrequenz von 5 Hz. Der Laser wurde nach 60 s abgeschaltet

Tabelle 17.2. Vergleich der Größe von Knochennekrose in Abhängigkeit von der Laserenergie nach der Koagulation mit dem Ho:YAG-Laser

Pulsennergie (mJ)	Wiederholrate (Hz)	Gesamtenergie (J)	Abstand vom Faser (mm)	Maximale Temperatur (°C)
500	10	300	5	65
1500	5	450	5	> 80
1000	10	600	5	60
1500	10	900	5	> 80
1500	10	900	10	50

17.3.2 Histologische Untersuchungen

Nach der Laserkoagulation wurde die Gewebeprobe für histologische Untersuchung mit Kryomikrotomschnitten vorbereitet, wie Abb. 17.16 zeigt. Es wurde beachtet, dass die Koagulation des Knochengewebes von der starken Karbonisation sogar bei der niedrigeren Impulsenergie begleitet wird. Dieses liegt an hoher Impulsenergie von Ho:YAG-Laser und physikalischen Eigenschaften des kortikalen Knochens (s. Kap. 17.2.1). Laserimpulse liefern eine beträchtliche Menge Energie innerhalb eines kleinen Gewebevolumens (thermische Durchgrifttiefe $\approx 250 \mu\text{m}$), die in die Wärme durch die Schwingungs- und Rotationsenergiezustände der Wassermoleküle umgewandelt wird. Diese führt zu einer plötzlichen Verdampfung des Wassers innerhalb des Gewebes, was in Mikroexplosionen resultiert, die auch Gewebefragmente mit hoher kinetischen Energie ausstoßen.

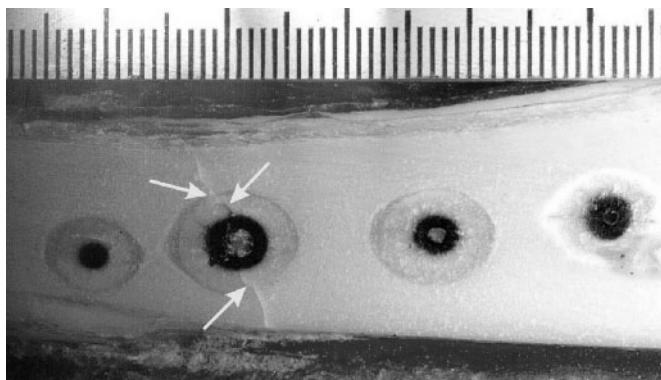


Abb. 17.16. Kryomikrotomschnitt nach der Koagulation mit dem Ho:YAG-Laser. Laserparameter (von links nach rechts): 500 mJ bei 10 Hz, 1500 mJ bei 10 Hz, 1000 mJ bei 10 Hz und 1000 mJ bei 5 Hz. Die Pfeile zeigen Risse durch Verschmelzen und Rekristallisierung der Knochenmatrix

17.3.3 Knochenkoagulation mit dem Nd:YAG-Laser

Als zweiter Laser kam ein leistungsfähiges Nd:YAG-Lasersystem ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) zum Einsatz. Das System arbeitet im kontinierlichen Betrieb (cw) mit maximaler Ausgangsenergie von 28 W (TEM_{00}). Insgesamt wurden fünf Messungen mit der Gesamtenergie von 360–2000 J durchgeführt (s. Tabelle 17.3).

In Abb. 17.17 wurde die anfängliche Laserleistung auf 4 W gesetzt und nach 180 s auf 7 W für weitere 180 s, was zu einer Gesamtenergi deposition von 2000 J führte. Ein interessantes Ergebnis der Temperaturmessung ist der Unterschied in der Temperatur entlang der Knochenachse verglichen mit der lateralen Richtung. Abbildung 17.17 zeigt, dass der Temperaturanstieg in lateraler Richtung zweimal höher als in axialer Richtung war. Dies liegt an

Tabelle 17.3. Vergleich der Kochennekrose mit applizierter Laserleistung

Gesamtenergie (J)	Laserleistung (W)	Abstand zur Faser (mm)	Maximaltemperatur °C
360	2	3,5 (lateral)	63
360	2	5,5 (lateral)	54
400	2,25	5 (lateral)	64
450	2,5	3 (axial)	76
500	2,8	4,5 (lateral)	58
2000	7 (4)	4 (axial)	> 80
2000	7 (4)	5 (lateral)	62
2000	7 (4)	9 (lateral)	62

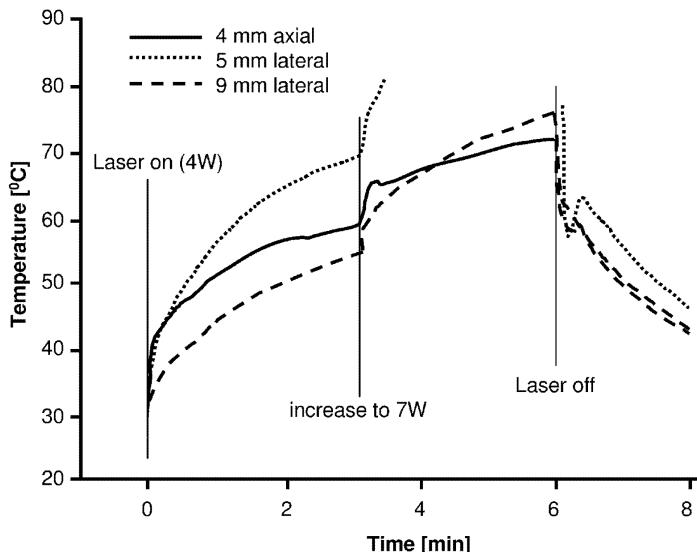


Abb. 17.17. Temperatur während der Laserkoagulation mit einem Nd:YAG-Laser. Die Laserleistung wurde bei einer Gesamtenergie von 2000 J von 4 W auf 7 W erhöht

der Struktur des kortikalen Knochen. Diese Struktur führt zur Vorzugsdiffusion entlang der Knochenachse. Temperaturmessungen mit dem fluoroptischen Thermometer sind jedoch auf 80°C begrenzt, wodurch die Maximalwerte nicht genau bestimmt werden können.

Tabelle 17.3 zeigt, dass eine Applikation von 360 J mit dem Nd:YAG-Laser die Knochenzellen auf mehr als 50°C innerhalb eines Abstands von 5,5 mm von der Laserfaser erhitzt kann. Bei einer Gesamtenergie von 2000 J erreicht die Größe der Gewebekoagulation mehr als 9 mm, also können Tumorgrößen bis 2 cm behandelt werden.

Histologische Untersuchungen der Gewebeprobe nach der Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser zeigen keine Karbonisation (Abb. 17.18), selbst nach Applikation von 2000 J.

Diese Resultate implizieren die Überlegenheit des Nd:YAG-Laser gegenüber dem Ho:YAG-Laser in Bezug auf LITT bei Knochengewebe, denn Karbonisation ist nicht aufgetreten. Dies erlaubt eine tiefere und schnellere Penetration der Laserstrahlung ins Gewebe und dadurch in größere Koagulationsvolumina.

17.3.4 Knochenkoagulation mit dem Diodenlaser

Das dritte untersuchte Lasersystem war ein Diodenlaser ($\lambda = 940 \text{ nm}$) mit einer maximalen Ausgangsleistung von 50 W. Der Laser ist ein kompaktes Turnkey-System für klinische Anwendungen. Durch seine Wellenlänge von 940 nm ist die Laser-Gewebe-Wechselwirkung vorwiegend thermisch.

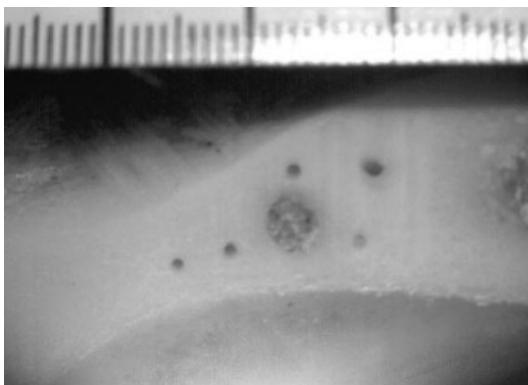


Abb. 17.18. Schnitt nach Koagulation mit dem Nd:YAG-Laser. Applizierte Gesamtenergie war 2000 J

Im Standardmodus kann die Ausgangsleistung von 1–50 W in 1-W-Schritten erhöht werden. Der Laser ist mit einem speziellen Lightguide-Protecting-System (LPS) ausgestattet, welches das Fluoreszenzlicht detektiert, das bei der Karbonisation von Gewebe entsteht und deshalb einen einfachen Schutz gegen Karbonisation gewährt. Der Versuchsaufbau war analog zu den bereits erwähnten Lasersystemen. Eine Analyse der Temperatur während der Laserkoagulation mit dem Diodenlaser ist in Abb. 17.19 dargestellt. Die LITT von Knochengewebe mit dem Diodenlaser ist für eine maximale Tumogröße bis 2 cm Durchmesser sinnvoll. Dies ist vergleichbar mit der Koagulation mit

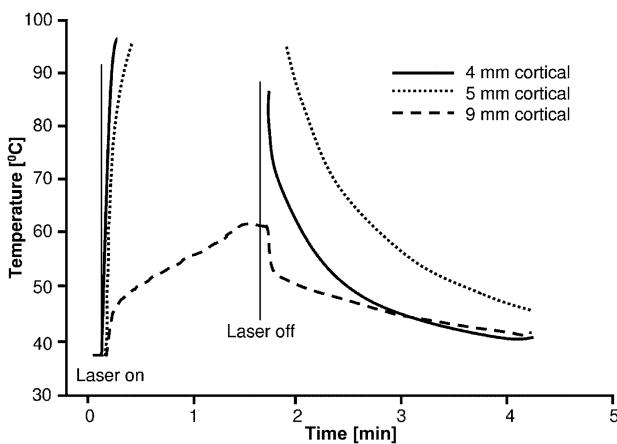


Abb. 17.19. Temperatur während der Laserkoagulation des kortikalen Knochens mit dem Diodenlaser. Die Laserleistung betrug 10 W bei einer Gesamtenergie von 900 J

Tabelle 17.4. Vergleich der Knochennekrose nach applizierter Laserenergie mit dem Diodenlaser

Gesamtenergie (J)	Laserleistung (W)	Abstand zur Faser (mm)	Maximaltemperatur °C
380	7	5	50
500	5	5	48
720	12	8	60
900	10	10	62

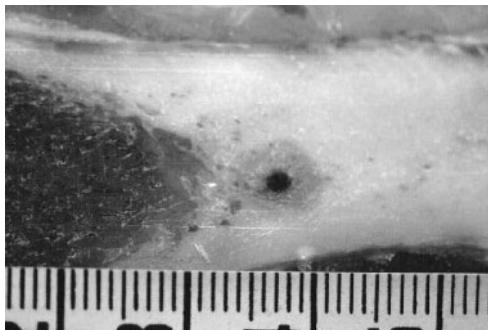


Abb. 17.20. Kryomikrotomschnitt nach Koagulation mit dem Diodenlaser. Die applizierte Gesamtenergie betrug 900 J (10 W)

dem Nd:YAG-Laser. Die applizierte Gesamtenergie war jedoch nur halb so groß.

Wie der Nd:YAG-Laser erlaubt der Diodenlaser die Koagulation von Tumogrößen bis 2 cm Durchmesser bei einer Gesamtenergie von weniger als 1000 J. Abbildung 17.20 zeigt den Kryotomschnitt nach Bestrahlung mit 900 J (10 W) mit dem Diodenlaser. Die Karbonisation war auf ein Gebiet von 2–3 mm begrenzt.

17.3.5 Online-MRI-Temperaturkontrolle während Laserkoagulation von Knochengewebe

Durch eine Platzierung von Temperaturfühlern an diskreten Punkten erhält man nur unzureichende Informationen über die Temperaturverteilung im Tumor. Genaue Informationen sind jedoch von großer Wichtigkeit, denn Tumorzellen können an „cold spots“ überleben, und gesundes Gewebe kann an „hot spots“ geschädigt werden.

Die Temperaturabhängigkeit verschiedener physikalischer Parameter, die das MR Bild beeinflussen, kann als nichtinvasive Methode zur Temperaturüberwachung verwendet werden [1, 5, 22, 23, 27, 29, 31]. Drei verschiedene Ansätze zur MR-Thermometrie sind derzeit verfügbar:

- die Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 ,
- die Temperaturabhängigkeit der Protonenresonanzfrequenz (PRF oder „chemical shift“) und
- die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D.

Alle drei Methoden wurden zur Feststellung der Anwendbarkeit während der Laserkoagulation von Knochengewebe untersucht.

Nach der Untersuchung der drei Lasersysteme hat sich der Ho:YAG-Laser als ungünstig für die Laserknochenkoagulation wegen intensiver Verkohlung erwiesen. Der Nd:YAG-Laser ist kein Turnkey-System und erfordert die Installation einer Spannungsversorgung und einer Wasserkühlung, die am MRT-Scanner nicht zur Verfügung standen. Deshalb wurde nur der Diodenlaser unter Online-MRT-Temperaturkontrolle eingesetzt.

Experimenteller Aufbau. Alle Experimente wurden mit einem 1,5-T-supraleitenden Ganzkörperscanner (Magnetom Vision, Siemens AG, Deutschland) am Deutschen Krebsforschungszentrum durchgeführt. Abbildung 17.21 zeigt den experimentellen Aufbau. Abbildung 17.22 zeigt zwei T_1 -gewichtete Scans vor (links) und nach (rechts) Laserkoagulation mit 600 J (120 s).

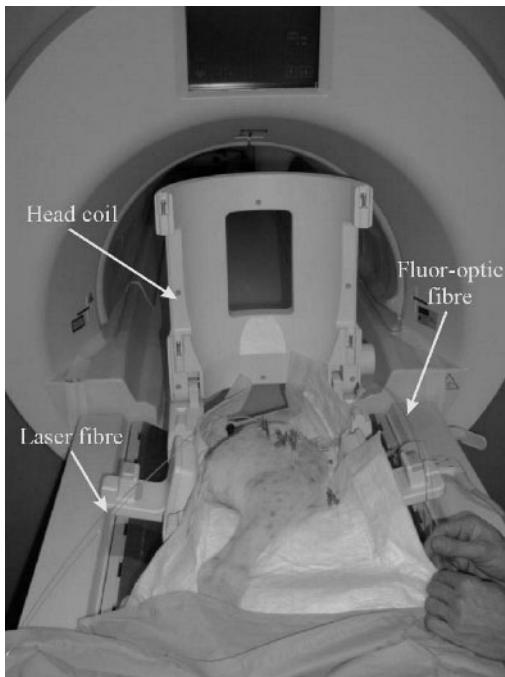


Abb. 17.21. Aufbau des Experiments zur Laserkoagulation unter Onlin-MRT-Temperaturkontrolle mit einem 1,5-T-Scanner und einer Kopfspule zur Signalaufnahme. Um die Laserfaser und die fluoroptische Faser vor Bruch zu schützen, wurden diese in einer Venenverweilkanüle befestigt

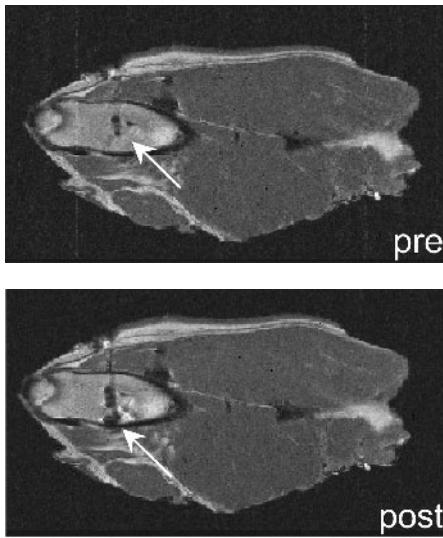


Abb. 17.22. T_1 -gewichtete MRT vor (links) und nach (rechts) Laserkoagulation mit 600 J (120 s). Nach der Applikation des Kontrastmediums erscheint die Laserläsion im Knochenmark als eine hypointense Region

Spinechosequenzen sind ungeeignet zur schnellen Temperaturkontrolle mit Update-Raten von 1–2 s wegen ihrer langen Aufnahmezeit. Deshalb muss eine schnellere Pulssequenz benutzt werden, die Gradientenechosequenz. Außerdem können mit kleinen Flip-Winkeln, *Fast-low-angle-shot-* (FLASH-)Sequenzen durchgeführt werden. Mit kurzen Wiederholraten, TR (Turbo-FLASH) und den neuesten ultraschnellen Gradientensystemen können die Update-Zeiten auf wenige ms reduziert werden.

T_1 -Methode. Nach Sättigung mit einem 90-Grad-Puls stellt sich die T_1 -Zeit mit variabler Zeitspanne T_{rec} ein, gefolgt von einer FLASH-Sequenz mit kleinem Flip-Winkel ($10\text{--}15^\circ$) und wird deshalb Sättigungswiederherstellung TurboFLASH (SRTF) [12] genannt. Nach einer anfänglichen Temperatur T_0 ist die Magnetisierung gegeben durch [6]

$$S(T_0) = S_\infty(T_0) [1 - \exp\{-T_{\text{rec}}/T_1(T_0)\}] . \quad (17.1)$$

$S_\infty(T_0)$ ¹ enthält die Gleichgewichtsmagnetisierung, die nach dem Curie-Gesetz proportional zu $1/T$ ist, woraus folgt

$$S_\infty(T_0 + \Delta T) = \frac{S_\infty(T_0)}{1 + (\Delta T/T_0)} . \quad (17.2)$$

¹ Der Index ∞ drückt aus, dass nach einer ausreichend langen Zeitspanne die longitudinale Magnetisierung ihren Ursprungswert erreicht hat → Gleichgewichtsmagnetisierung.

Unter der Annahme einer linearen Abhängigkeit von T_1 mit der Temperatur $T_1(T_0 + \Delta T) = T_1(T_0) + m\Delta T_0$ ist die Signalintensität gegenen durch

$$S(t_0 + \Delta T) = S_\infty(T_0) \cdot \underbrace{\frac{1}{1 + \Delta T/T_0}}_{\text{I}} \cdot \underbrace{\frac{1 - \exp\{-T_{\text{rec}}/(T_1(T_0) + m\Delta T)\}}{1 - \exp\{-T_{\text{rec}}/T_1(T_0)\}}}_{\text{II}}. \quad (17.3)$$

Ausdruck I zeigt die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtszustandsmagnetisierung. Die Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit ist gegeben durch Ausdruck II. Die Wiederherstellungszeit T_{rec} wird gewählt, um eine maximale Temperatursensitat zu erreichen. Die gewebeabhangigen Parameter $T_1(T_0)$ und $m = dT_1/dT_0$ müssen aus Kalibriermessungen berechnet werden. Verschiedene SRTF-Sequenzen mit unterschiedlichem T_{rec} müssen für jedes Gewebe gemessen werden. Vergleicht man T_{rec} mit der Signalamplitude nach (17.1) mit einem Least-square-Algorithmus, so erhält man den Mittelwert von T_1 . Bei Wiederholung bei verschiedenen Temperaturen erhält man die Parameter $T_1(T_0)$ und $m = dT_1/dT_0$ und dadurch einen Werrt für $T_1(T)$.

Vor dem Beginn der Messung wird eine Temperaturtabelle von einem Referenzbild mit (17.3) bestimmt. Die aktuelle Temperatur wird dann online mit Update-Zeiten von 2–3 s berechnet. Dadurch wird eine quasi Echtzeittemperaturkontrolle erreicht.

Während des Experiments wurden SRFT-Bilder für die T_1 -Relaxations-temperatur mit folgenden Parametern aufgenommen: TR=10,2 ms, TE=4 ms, $T_{\text{rec}} = 1100$ ms, Flip-Winkel=12°, MA=128×128 bei einer gesamten Aufnahmzeit von 1,5 s. Die räumliche Auflösung war 1,95 × 1,95 mm². Die farbkodierte Bilder zeigen, dass die Temperatur gegenüber der Laserfaser 100°C überstieg. Dies stimmt mit den faseroptischen Messungen überein, wobei die maximale Temperatur 130°C erreichte. Das farbkodierte Bild wurde mit einer Kalibrierung für Fettgewebe berechnet und dann dem anatomischen Bild mit einem 3 × 3 Pixelfilter überlagert. Es gibt jedoch ein Problem bei Kalibriertemperaturen jenseits von 65°C, denn Temperaturänderungen korrelieren nicht länger linear mit Änderungen der T_1 -Relaxationszeit.

Zusammenfassung

Drei unterschiedliche Lasersysteme (Ho:YAG, Nd:YAG und Laserdiode) wurden getestet. Die thermische Koagulation der Knochentumoren war für Tumoren bis zu 2 cm im Durchmesser möglich. Der Diodenlaser zeigte sich als am besten geeignet für zukünftige In-vivo-Untersuchungen aufgrund der effektiven Koagulation und der einfachen Handhabung im MRT.

Temperaturmessungen während der Laserkoagulation des kortikalen Knochengewebes mittels Ho:YAG-Laser zeigten, dass wegen seiner hohen Im-

pulsenergie von 1800 mJ eine starke Karbonisation auftrat. Die hohen Temperaturen haben das Knochenmineral geschmolzen. Wegen starker Karbonisation und begrenzter Koagulation von ungefähr 1,2 cm im Durchmesser wurde der Ho:YAG-Laser als ungeeignet für Laserkoagulation des kortikalen Knochens eingestuft.

Die glatten Lichtfasern erwiesen sich während der Experimente als leistungsfähig und zuverlässig. Die Anwendung von LITT-Fasern mit einer Difusorspitze war wegen der geringen Tumorgröße nicht nötig. Diese Fasern sind zudem zerbrechlich und benötigen zusätzliche Kühlung.

Literatur

1. Ascher PW, Fan M, Schrottner O, Erbner F, Kleinert R (1993) Interstitielle laserassistierte Thermotherapie zentraler Hirntumore unter direkter Magnet Resonanz Kontrolle. In: Berlien H-P, Müller GJ (Hrsg) Angewandte Lasermedizin. Ecomed, Landsberg/Lech
2. Bachert P, Schad LR, Bock M, Knopp MV, Ebert M, Grossmann T, Heil W, Hafmann D, Surkau R, Otten EW (1996) Nuclear magnetic resonance imaging of airways in humans with use of hyperpolarized ³He. Magnetic Resonance in Medicine 36:192–196
3. Berlien PH, Müller GJ (1992) Angewandte Lasermedizin. Ecomed, Landsberg/Lech
4. Bisgard JD, Musselman MM (1940) Scoliosis: its experimental production and growth correction; growth and fusion of vertebral bodies. Surg Gynecol Obstet 70:1029–1036
5. Blüml S, Schad LR, Stepanow B, Lorenz WJ (1993) Spin-lattice relaxation time measurement by means of a turboFLASH technique. Magn Resonance Med 30:289–295
6. Bohris C (1999) Temperaturmessung mit der Magnet-Resonanz-Tomographie zur Überwachung von medizinischen Thermotherapien mit Laser oder Ultraschall: Dissertation, University of Heidelberg
7. Canadell J, Beguiristain JL (1979) Experimental Scoliosis by Epiphysiodesis of the Neurocentral Cartilage in Pigs: J Bone Joint Surg 61 B:121
8. Duck FA (1990) Physical properties of tissue. Academic Press, London
9. Freyschmidt J, Ostertag H, Jundt G (1998) Knochentumoren. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
10. Gangi A, Dietemann JL, Gauth S, Sinclair L, Sibilia J, Mortazavi R, Steib JP, Roy C (1998) Percutaneous laser photocoagulation of spinal osteoid osteomas under CT guidance. Am J Neuroradiol 19:1955–1958
11. Haas SL (1939) Experimental production of scoliosis. J Bone Joint Surg 21 A:963–969
12. Haase A (1990) Snapshot-FLASH MRI: applications to T_1 , T_2 and chemical shift imaging. Magnetic Resonance in Medicine 13:77–89
13. Hachem K, Haddad S, Aoun N, Tamraz J, Attalah N (1997) Intérêt De L'IRM Dans Le Diagnostic D'Ostéome Ostéoïde. J de Radiol 78:635–641
14. Harrington PR (1962) Treatment of scoliosis: correlation and internal fixation by spine instrumentation. J Bone Joint Surg 44 A:591–610

15. Helfmann J (1992) Nichtlineare Prozesse. In: Berlien PH, Müller GJ (Hrsg) *Angewandte Lasermedizin*. Ecomed, Landsberg/Lech
16. Horton WA (1993) Connective tissue and its heritable disorders. Wiley-Liss, New York, pp. 183–200
17. Keeman RJ, Ferson PF, Landreneau RJ, Hazelrigg SR (1993) Use of lasers in thoracoscopy. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 5:294–297
18. Kerr JB (1998) *Atlas of functional histology*. Mosby, Sydney
19. Kuhne O (1998) Photoablation an Hartgewebe. Diplomaarbeit, Fachhochschule Aachen
20. Lonstein JE, Bradford DS, Winter RB, Ogilvie JW (1995) *Textbook of scoliosis and other spinal deformities*. 3rd edn. Saunders, Philadelphia, p. 309
21. Miller FA, Wilkins CH (1952) Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions. *Analyt Chem* 24:1253–1275
22. Morrison PR, Jolers FA, Charons D, Mulkern RV, Hushen SG, Margalis R, Fried MP (1998) MRI of laser-induced interstitial thermal injury in an in vivo animal liver model with histologic correlation. *J Magn Resonance Imaging* 8:57–63
23. Müller-Lisse UG, Heuck AF, Thoma M, Mutschler R, Schneede P, Weninger E, Faber S, Hofstetter A, Reiser MF (1998) Predictability of the size of laser-induced lesions in T_1 -weighted MR images obtained during interstitial laser-induced thermotherapy of benign prostatic hyperplasia. *J Magn Resonance Imaging* 8:31–39
24. Newesely H (1977) High temperature behaviour of hydroxy- and fluorapatite. *J Oral Rehab* 4:97–104
25. Nyquist RA, Kagel RO (1971) *Infrared spectra of inorganic compounds*. Academic Press, New York
26. O'Connell JX, Nanthakumar SS, Nielsen GP, Rosenberg AE (1998) Osteoid osteoma: the uniquely innervated bone tumor. *Mod Pathol* 11:175–180
27. Olsrud J, Wiresaqm R, Brockstedt S, Nilsson AMK, Tranberg K-G, Ståhlberg F, Persson BRR (1998) MRI thermometry in phantoms by use of the proton resonance frequency shift method: application to interstitial laser thermotherapy. *Phys Med Biol* 43:2597–2613
28. Pacher W (1939) Operative Erzeugung einer Skoliose im Tierversuch. *Z Orthop* 69:140–154
29. Paley M, Clemence M, Hall-Craggs MA, Wilkinson ID, Lees WR, Harrison MJG (1997) High magnetic susceptibility coatings for visualisation of optical fibers on a specialised interventional MRI system. *Europ Radiol* 7:1341–1342
30. Picci P, Mirra M (1989) *Bone tumors: clinical radiology and pathologic relations*. Lea & Febiger, Philadelphia, London
31. Reimer P, Bremer C, Horch C, Morgenroth C, Allkemper T, Schuierer G (1998) MR-Monitored LITT as a palliative concept in patients with high grade gliomas: preliminary clinical experience. *J Magn Resonance Imaging* 8:240–244
32. Roaf R (1960) Vertebral growth and its mechanical control. *J Bone Joint Surg* 42 B:40–59
33. Scholz C, Grothues-Spork M (1992) Die Bearbeitung von Knochen mit dem Laser. In: Berlien PH, Müller GJ (Hrsg) *Angewandte Lasermedizin*. Ecomed, Landsberg/Lech
34. Schuknecht B, Daecke W, Bernd L, Lange D, Hoffend J (1998) Erfahrungen mit der intraoperativen Lokalisation von Osteoidosteomen mit einem Szintillationsdetektor. *Aktuelle Traumatologie* 28:105–109

35. Truppe M, Freysinger W, Gunkel A, Thumfart W (1994) The artma virtual patient: 3D monitoring of endoscopic surgery. Medicine Meets Virtual Reality II, San Diego, pp. 221
36. Wittek H (1924) Operative Behandlung der Skoliose. Z Orthop Chir 44:226–235
37. Zielke K, Stundat R, Beaujean F (1976) Ventrale Derotation Spondylodese: Vorläufiger Ergebnisbericht über 26 operierte Fälle. Archiv der Orthopädischen Unfall-Chirurgie 85:257

18 Stereotaktische Laserneurochirurgie

K. Greger, J. Bille, W. Schlegel, V. Sturm

Behandlungsverfahren für Hirntumoren sind heute üblicherweise die neurochirurgische Resektion oder die Strahlenbehandlung [11]. Obwohl durch die Entwicklung mikroneurochirurgischer Methoden wesentliche Verbesserungen in der operativen Tumorbehandlung erzielt wurden, sind viele Operationen noch immer mit einer erheblichen Traumatisierung gesunden Hirngewebes belastet. Dies führt oft zu schweren, zum Teil irreversiblen Nebenwirkungen wie Lähmungen, Seh- oder Hörstörungen, Sprachstörungen oder physischen und mentalen Beeinträchtigungen. Tiefliegende Hirntumoren lassen sich meist nur teilweise oder gar nicht entfernen. Bei der Strahlenbehandlung werden bei zu hoher Belastung strahlensensible Hirnareale geschädigt. Darüber hinaus führen die toxischen Wirkungen des im Gehirn verbleibenden, abgetöteten Tumormaterials zu starken Nebenwirkungen.

Als Alternative zur herkömmlichen Chirurgie oder Strahlentherapie können Hirntumoren auch mit Laserstrahlung behandelt werden. Dabei kommen zur Zeit lediglich thermisch wirkende Laser (Nd:YAG [12], CO₂ [7]) zum Einsatz. Deren Energie führt zur Erwärmung und bei Temperaturen von über 60°C zur Denaturierung (Nd:YAG-Laser) oder zur Verdampfung (CO₂-Laser) des bestrahlten Gewebes. Da das Tumorgewebe nicht abgetragen, sondern nur koaguliert wird, bleibt eine Traumatisierung unvermeidbar, da der abgetötete Tumor ein großes Volumen einnimmt.

Eine zusätzliche Schwierigkeit bereitet die exakte Dosierung der deponierten Energie, da durch thermische Diffusion auch benachbartes gesundes Gewebe geschädigt werden kann. Entscheidend für die thermische Diffusionslänge ist zum einen die Bestrahlungszeit, also Pulsdauer und Repetitionsrate des Lasers, sowie die Diffusivität, die wiederum von der thermischen Leitfähigkeit, der spezifischen Wärme und der Dichte des Gewebes abhängt. Da die Wärmediffusion in alle Raumrichtungen gleichermaßen erfolgt, erscheint eine präzise Koagulation ausschließlich des Tumorgewebes selbst bei genauer Kenntnis der optischen und thermischen Gewebeigenschaften unmöglich.

Es wurde daher versucht, diesen Problemen mit einem neuen Ansatz der Laserablation zu begegnen. Laserpulse mit einer Dauer von einigen Pikosekunden (ca. 30 ps) haben einen photodisruptiven Ablationsprozess zur Folge. Somit wird bestrahltes Gewebe „kalt“ abgetragen, sodass es zu einer viel geringeren thermischen Belastung von benachbarten Arealen kommt [4, 9]. Dabei lässt sich das Tumorgewebe in Schritten von einigen μm sehr schonend und präzise abtragen. Während in den vergangenen 30 Jahren nur thermisch

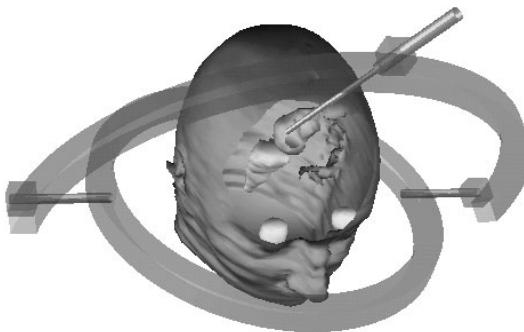


Abb. 18.1. Dreidimensionale Computergraphik zur Lokalisation eines Tumors relativ zum Schädel des Patienten. Die Darstellung ist aus CT- und MRT-Bilddaten abgeleitet

wirkende Laser in der Medizin zum Einsatz kamen, soll jetzt erstmals ein Lasertyp der neuesten Generation in der Neurochirurgie eingesetzt werden: der diodengepumpte Pikosekundenfestkörperlaser.

Die Möglichkeiten dieser neuen Entwicklungen sind nur durch Kombination moderner Lasertechnik mit stereotaktischen Lokalisations-, Therapieplanungs- und Operationsverfahren voll ausschöpfbar. (Bei stereotaktischen Methoden wird ein Hirnareal gezielt punktförmig behandelt.) Auf der Basis dreidimensionaler Bilddaten, die sich mit Hilfe der Kernspin- (NMR) und Computertomographie (CT) gewinnen lassen, gelingt es heute, die Lage des Tumors innerhalb des Gehirns mit hoher Genauigkeit anzugeben (Abb. 18.1). Um tiefliegende Tumoren für den Laserstrahl zugänglich zu machen, wird als Strahlführungssystem eine scannende Strahlsonde entwickelt, die sich in das vorhandene stereotaktische Operationssystem integrieren lässt (Abb. 18.2). Die Positionierung der Strahlsonde im Tumor erfolgt über ein stereotaktisches Gelenksystem, wobei die Führung der Sonde auf der Auswertung kernspintomographischer Bilder basiert. Der Operationsfortschritt wird durch geeignete bildgebende Verfahren in Echtzeit überwacht. Das Gesamtsystem zeigt schematisch Abb. 18.3.

Unser erstes Ziel des klinischen Einsatzes ist die Anwendung der stereotaktischen Lasertechnik als unterstützendes Therapieverfahren. Dabei soll der durch Bestrahlung mit hoher Dosisleistung nekrotisierte, massive Tumor vom Laserstrahl ablatiert und die Fragmente aus dem Gehirn durch Absaugverfahren entfernt werden. Für eine spätere Phase ist geplant, ohne vorherige Strahlenbehandlung den Tumor ausschließlich mittels der Laserablation zu entfernen. Dabei wird bei bösartigen Tumoren zusätzlich eine Ganzhirnbestrahlung kleiner Dosisleistung zur Behandlung diffuser tumoröser Infiltrierungen des gesunden Gehirns erfolgen.



Abb. 18.2. Prototyp der stereotaktischen Strahlsonde

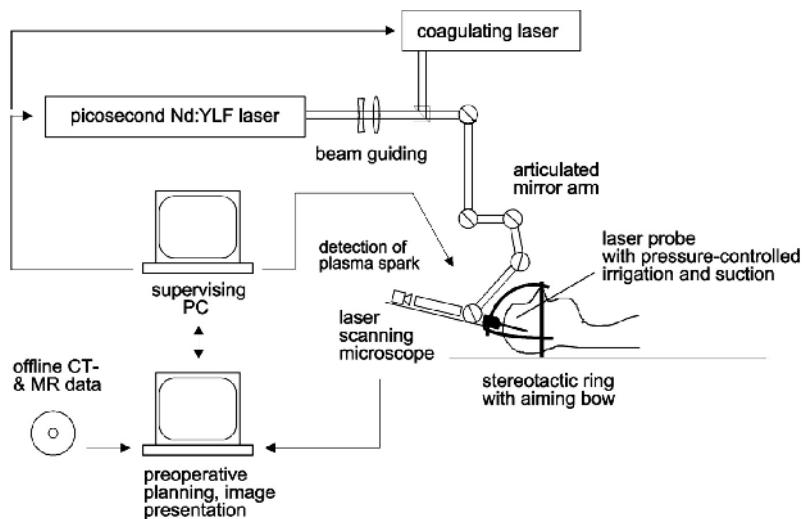


Abb. 18.3. Gesamtsystem zur stereotaktischen Laserneurochirurgie. Die Strahlsonde ist in das stereotaktische Zielsystem integriert [6]

18.1 Stereotaktische Bestrahlungstechniken

In den letzten Jahren hat sich als Standardtherapie für nichtoperable Hirntumoren die stereotaktische Strahlentherapie etabliert. In Zusammenarbeit von Neuroonkologen der Universität Köln und Medizinphysikern des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) wurde seit 1979 in Heidelberg diese an sich schon 35 Jahre alte Therapiemethode zu neuer Blüte gebracht: Stereotaktisch nehmen die Ärzte das Krebsgewebe unter Strahlbeschuss. Gesundes Gewebe bleibt dabei weitgehend verschont, ein Computer passt die Strahlungsfelder möglichst exakt dem Tumorgewebe an.

Für die Planung der stereotaktischen Strahlentherapie wurde ein Programmsystem entwickelt, mit dessen Hilfe sich Zielvolumina und Lage der Risikoorgane auf der Grundlage von CT-Bildern räumlich bestimmen lassen. Neben der Berechnung von räumlichen Dosisverteilungen (Abb. 18.4) wurden in diesem Programmsystem Möglichkeiten der Berechnung nichtkoplanarer, irregulär geformter und dynamischer Strahlenfelder implementiert. Außerdem rekonstruieren die Programme beliebige Schnittebenen und stellen die Oberflächen von Organen und Isodosenflächen dar. Dies ermöglicht eine problemangepasste Veranschaulichung der Dosisverteilung. Besonderer Wert wurde auf die quantitative Bewertung von dreidimensionalen Therapieplänen in Form von Dosisvolumenhistogrammen gelegt.

Für die Planung der dreidimensionalen stereotaktischen Konvergenzbestrahlung wurden Programmsysteme mit einem zeitoptimierten Dosisberechnungsalgorithmus und der Möglichkeit einer genauen Isozentrumlokalisation im stereotaktischen Koordinatensystem entwickelt. Das Programm erlaubt es,

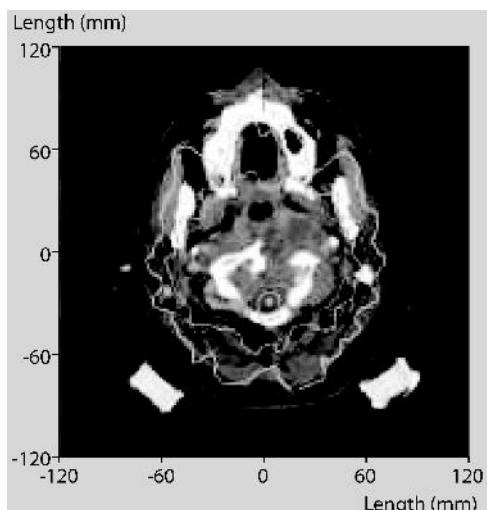


Abb. 18.4. Computersimulation der Dosis bei der Bestrahlung eines Hirntumors

die dreidimensionale Strahlendosisverteilung einer nichtkoplanaren Pendelbestrahlung zu berechnen und darzustellen, wobei sich die Lage des Isozentrums der Bestrahlung mit einer Genauigkeit von ca. 1 mm berechnen und mit Hilfe des stereotaktischen Zielgeräts am Beschleuniger einstellen lässt.

Für die stereotaktisch geführte, interstitielle Hirntumorthерапie wurde ein Programm zur Implantation radioaktiver Jod-125-Stäbchen, sog. *Seeds*, und zur Berechnung und Darstellung der dreidimensionalen Dosisverteilungen entwickelt. Hierin ist erstmals eine automatische Optimierung der Aktivitäten und Positionen vorgesehen, die eine optimale Anpassung eines bestimmten Dosiswertes an die Oberfläche des Zielvolumens gestattet. Der praktische Einsatz des Optimierungsverfahrens hat zu einer drastischen Reduktion der Planungszeiten geführt.

18.1.1 Stereotaxie

Zwei Arbeitsgruppen am DKFZ in Heidelberg und an der Universität Köln beschäftigen sich seit über 10 Jahren mit der Planung und Durchführung stereotaktischer Diagnose- und Therapieverfahren. In diesem Zusammenhang wurden auch Computerverfahren für die stereotaktische Konvergenzbestrahlung und für die interstitielle stereotaktisch geführte Strahlentherapie entwickelt.

Am Schädel des Patienten wird unverrückbar ein stereotaktischer Grundring befestigt (Abb. 18.6). An ihm können sowohl Messphantome für computer- und kernspintomographische Untersuchungen als auch Zielsysteme zur hochpräzisen Führung beliebiger Sonden fixiert werden. Der Grundring dient als Referenz für ein Koordinatensystem, in dem sich Zielpunkt und Zielvolumina, die auf vorausgegangene CT- und NMR-Untersuchungen basieren, zwei- und dreidimensional lokalisieren und mit äußerster Präzision auf exakt vorausberechnetem Wege erreichen lassen (Abb. 18.5). Die Genauigkeit liegt im Bereich von wenigen Zehntelmillimetern.

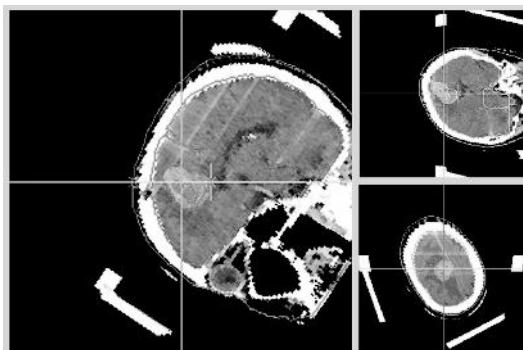


Abb. 18.5. Computersimulation zur interaktiven Optimierung des Zugangswegs der Gehirnsonde schon vor der Operation



Abb. 18.6. Patient mit stereotaktischem Ring aus Kohlefaser. Auf dem Grundring ist das Zielsystem montiert

Die am DKFZ entwickelten Verfahren wurden von der Arbeitsgruppe von V. Sturm, Abteilung für Stereotaxie und funktionelle Neurochirurgie der Universität Köln, routinemäßig und erfolgreich in der Hirntumorbehandlung eingesetzt.

18.2 Laserneurochirurgie

18.2.1 Laserlichtquellen

Für die grundlegenden Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Laserlicht und Hirngewebe wurden am Institut für Angewandte Physik in Heidelberg zwei Lasersysteme, ein Er:YAG- sowie ein Nd:YLF-Laser, eingesetzt.

Der Er:YAG-Laser ist ein Festkörperlaser, bei dem in dem Wirkskristall YAG- (Yttrium-Aluminium-Granat-)Er³⁺-Ionen eindotiert sind. Der Laser emittiert im mittleren Infrarot bei einer Wellenlänge von 2,94 µm. Die Pulsdauern liegen zwischen 10 µs (freilaufend) und 100 ns (im Q-switch-Betrieb). Als Pulskompressor kann ein elektrooptischer LiNbO₃-Kristall eingesetzt werden. Repetitionsraten bis 10 Hz sind möglich. Bei einer Pulsennergie von 10 mJ und einer Fokusgröße von 50 µm ergibt sich eine Energiedichte von 100 J/cm². Bei einer Pulsdauer von 100 ns entspricht dies einer Leistungsdichte von 109 W/cm². Die Eindringtiefe dieses Lasers in wasserhaltiges Gewebe beträgt

nen ca. $2\text{ }\mu\text{m}$ pro Puls, da die Laserstrahlung unmittelbar an die Vibrations- und Rotationsbanden des H_2O -Moleküls ankoppelt und somit effektiv absorbiert wird.

Außerdem wurde ein komplettes Nd:YLF-Lasersystem, bestehend aus einem Oszillator und einem regenerativen Verstärker, aufgebaut. Dieses System ist in Abb. 18.7 schematisch dargestellt. Laseraktives Material im Oszillator, wie im regenerativen Verstärker, ist ein Yttrium-Lithium-Fluorid-Wirkskristall, der zu 1,5% mit Nd³⁺-Ionen dotiert ist. Im Oszillator werden durch aktive Modenkopplung mittels eines akustooptischen Modulators Lichtpulse mit der Dauer von einigen ps und Energien von ca. 0,2 nJ erzeugt. Der zweite Strahlarm wird über einige Umlenkspiegel in den regenerativen Verstärker eingespeist, in dem durch zeitlich genau abgestimmtes Schalten einer LiNbO₃-Pockel-Zelle einzelne Pulse mit einstellbarer Repetitionsrate (bis 2 kHz) eingefangen werden (seeding). Diese Pulse werden nach etwa 100 Umläufen um einen Faktor 5×10^6 auf ca. 1 mJ verstärkt und schließlich wieder über die als Polarisationsschalter wirkende Pockel-Zelle ausgekoppelt (dumping). Dieses System emittiert Laserpulse mit 15 ps Pulslänge, 1 mJ

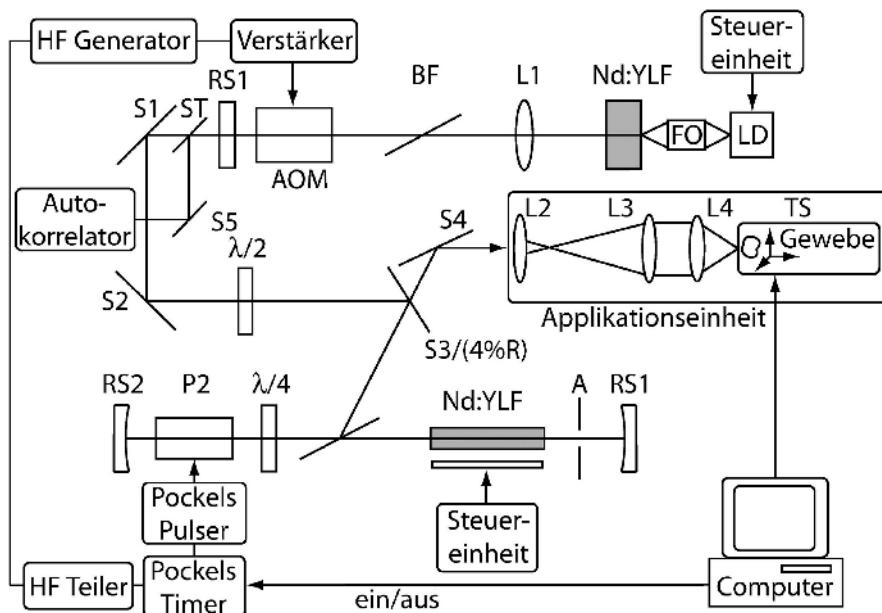


Abb. 18.7. Schematischer Aufbau des Nd:YLF-Lasersystems. LD Diodenlaser, FO Fokussierungsoptik, BF Brewster-Filter, AOM Akustooptischer Modulator, RS1 Ausgangskoppler (10% Transmission), BS Strahlteiler, $\lambda/2$: $\lambda/2$ -Plättchen, P Polarisator, $\lambda/4$: $\lambda/4$ -Plättchen, PZ Pockel-Zelle, RS Resonatorspiegel. Pikosekundenpulse werden im Oszillator erzeugt (oben), im regenerativen Verstärker verstärkt (unten) und in die Anwendungseinheit eingekoppelt

Pulsenergie und variabler Wiederholrate, von Einzelschuss bis zu 2 kHz. Bei einer Fokusgröße von 50 μm Durchmesser lassen sich Spitzenleistungsdichten von ca. 1013 W/cm² bzw. Energiedichten von ca. 100 J/cm² pro Puls erreichen. Dieser Wert liegt deutlich über dem Schwellenwert für die Ablation von Gewebe, der weitgehend unabhängig von der Art des Gewebes bei Pikosekundenpulsen bei ca. 1 J/cm² liegt.

Mit Hilfe zweier nichtlinearer BBO-Kristalle lassen sich durch Frequenzverdopplung bzw. -vervierfachung der ursprünglichen Laserwellenlänge auch Pikosekundenpulse hoher Leistungsdichte im grünen bzw. im UV-Bereich erzeugen. Bisher wurden bereits 100 μJ -Pulse bei 527 nm und 10 μJ -Pulse bei 266 nm erzeugt und für die Gewebeablation eingesetzt.

Der Mechanismus der Gewebesablation mit Pikosekundenlaserpulsen kann durch das Modell der plasmainduzierten Ablation beschrieben werden: Im Laserfokus erzeugt die extrem hohe Leistungsdichte (über 1012 W/cm²) so starke elektrische Felder (über 105 V/cm), dass ein Mikroplasma generiert wird und ein dielektrischer Durchbruch zur explosionsartigen Verdampfung des Gewebes führt [9].

18.2.2 Laserablation von Hirngewebe

Auf dem Gebiet der Laserablation von Hirngewebe führte unsere Arbeitsgruppe Voruntersuchungen durch [3]. Dazu wurden frische Rinderhirnproben auf einem computergesteuerten Tisch angebracht und ausgewählte Ablationsraster abgefahren. Nach der Bestrahlung wurden die Proben für die Histologie bzw. Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Um die Tiefenwirkung einzelner Pulse zu bestimmen, wurde die Schrittweite zwischen zwei aufeinanderfolgenden Laserschüssen entsprechend der Fokusgröße auf 25 μm eingestellt. Abbildung 18.8 zeigt die Ablationskurven (Ablationstiefe gegen Pulsenergie) für den freilaufenden Er:YAG-Laser sowie für das Nd:YLF-Pikosekundenlaser-System. Das mit einem Er:YAG-Puls abgetragene Volumen ist deutlich größer,

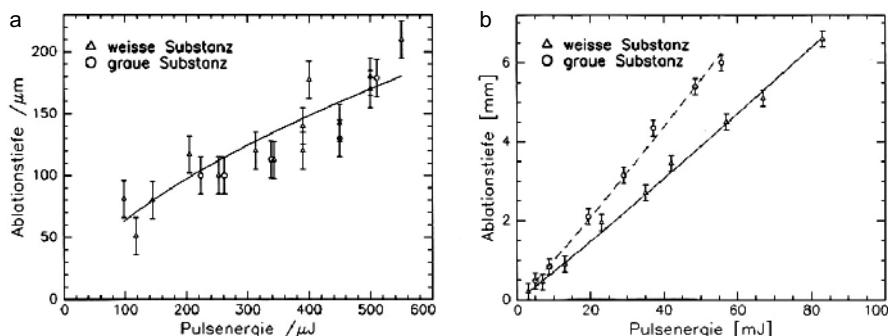


Abb. 18.8. Ablationskurven für (a) den Nd:YLF- und (b) den Er:YAG-Laser

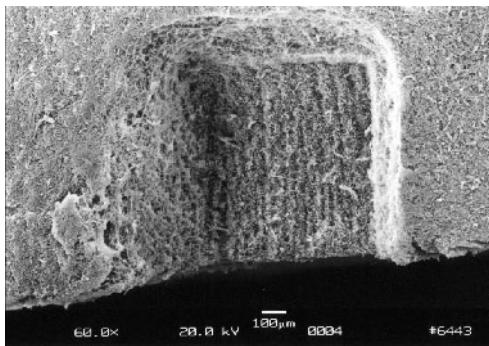


Abb. 18.9. SEM-Aufnahme einer mit dem Nd:YLF-Laser bestrahlten Gewebeprobe

jedoch ist hier die Repetitionsrate im Gegensatz zum Nd:YLF-Laser (bis 2 kHz) auf maximal 10 Hz begrenzt.

Um die Einsatzfähigkeit des Nd:YLF-Lasers in der funktionellen Neurochirurgie (gezielte Ausschaltung von kleineren lokalisierten Hirnarealen) zu demonstrieren, wurden auch größere Volumina ablatiert. Die Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen zeigen eine innerhalb von 2 min abgetragene tiefe Furche (Volumen ca. 1 mm^3) (Abb. 18.9). Eine erhebliche Steigerung der Effektivität des Ablationsprozesses (Abtragungsgeschwindigkeit) ist durch eine bessere Ausnutzung der hohen Repetitionsrate des regenerativen Verstärkers möglich. Die Aufnahme verdeutlicht die gute Qualität der Ablationskanten. Die an der oberen Kante sichtbaren Veränderungen sind nur oberflächlicher Natur, es handelt sich um Ablagerungen von abgetragenem Material.

Die Verletzungen des Gewebes wurden anhand von histologischen Untersuchungen bewertet. Dazu wurden mit dem Mikrotom wenige μm dicke Proben geschnitten und mit Farbstoffen angefärbt. Es zeigt sich die hervorragende Qualität der mit dem Nd:YLF-Lasersystem durchgeführten Schnitte. Es ließen sich keine Anzeichen für thermische Effekte (Karbonisation oder Koagulationszonen) beobachten. Erwartungsgemäß fiel die Begutachtung der Er:YAG-Proben weniger positiv aus; hier zeigten sich Koagulationszonen von ca. $50 \mu\text{m}$. Dies ist auf die längeren Pulsdauern von einigen $100 \mu\text{s}$ zurückzuführen.

Darüber hinaus wurden auch erste Messungen mit Pikosekundenpulsen bei anderen Wellenlängen durchgeführt (1,68, 2,92, 0,527, 0,355 und 0,266 μm). Die Strahlung bei 0,527 μm und 0,266 μm erhält man durch Frequenzverdopplung bzw. -vervierfachung der ursprünglichen Nd:YLF-Laserwellenlänge. Experimente bei anderen Wellenlängen konnten mit der freundlichen Unterstützung von H.J. Krause und W. Daum am Forschungszentrum Jülich durchgeführt werden [8]. Die histologischen Ergebnisse dieser Untersuchungen sind ebenso positiv: Thermische Effekte spielen bei der Bestrahlung mit Pikosekundenpulsen, unabhängig von der jeweiligen Wellen-

länge, keine Rolle. Der Abtragungsprozess ist bei Pulsen mit höherenergetischen Photonen effektiver, was sich auf eine verstärkte Erzeugung von freien Elektronen, die zur Plasmazündung erforderlich sind, zurückführen lässt.

18.2.3 Stereotaktische Lasersonde

Mittlerweile gibt es erste Entwicklungsarbeiten zur Realisierung einer stereotaktischen Strahlsonde, mit deren Hilfe sowohl ein diagnostischer als auch ein ablativender Laserstrahl in das Gehirn eingekoppelt werden. In Abb. 18.10a ist das Strahlführungssystem mit den optischen Komponenten zur Fokussierung und Strahlumlenkung schematisch dargestellt. Die Fokusgröße beträgt bei einer Wellenlänge von $1,053\text{ }\mu\text{m}$ ca. $50\text{ }\mu\text{m}$. Durch Translation in z -Richtung und Rotation der Sonde wird mit dem Fokus ein Zylindermantel abgetastet (Abb. 18.10d), dessen Radius sich durch computergesteuertes Verschieben der Linse sukzessive vergrößern lässt. Damit kann man das Zielvolumen in scheibenförmigen Teilbereichen mit einem Durchmesser von bis zu 60 mm abtragen (Abb. 18.10c).

In die Sonde sind miniaturisierte Spül- und Absaugsysteme integriert, die eine Verschmutzung der optischen Flächen mit Ablationsprodukten verhindern. Dies lässt sich mit einem integrierten Spülsystem erreichen, das den Umlenkspiegel mit einer optisch klaren physiologischen Kochsalzlösung

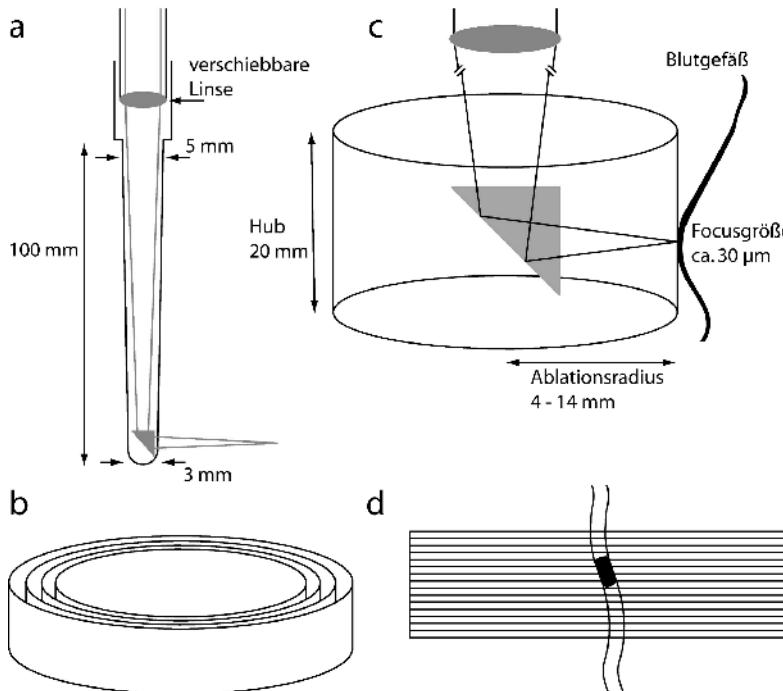


Abb. 18.10. Stereotaktische Strahlsonde

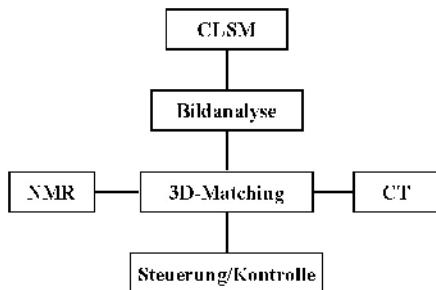


Abb. 18.11. Steuerung des Ablationsprozesses über mehrdimensionale Bildgewinnung mit Hilfe von *CLSM*: Konfokales Laserscanmikroskop (Strahlsonde), *NMR* Kernspintomographie, *CT* Röntgencomputertomographie

benutzt. Hierfür muss je eine flache Kanüle zum Spülen und Absaugen in die Strahlsonde integriert werden. Alternativ hierzu besteht die Möglichkeit, die Ablationsprodukte durch Unterdruck abzusaugen und die optischen Flächen unter Ausnutzung der hierbei entstehenden Strömungen freizuhalten. Welche der beiden Optionen den Vorzug erhalten wird, soll durch In-vitro-Experimente an Rinderhirn geklärt werden.

Zur Zeit wird ein Therapieplanungsprogramm entwickelt, das die räumliche Ablationswirkung eines zylindrisch scannenden Laserstrahls mathematisch simuliert und in MR-/CT-Schnittbildern oder dreidimensionalen Computergraphiken visualisiert. In vielen Punkten kann dabei auf analoge Programme der stereotaktischen Bestrahlungsplanung zurückgegriffen werden.

Abbildung 18.11 gibt schematisch die Interaktion der verschiedenen bildgebenden Verfahren zur Steuerung des Laserablationsprozesses wieder. Die Bewegung des Laserscannerkopfes und die Intensitätsvariation und Mischung von Strahlung mit verschiedenen Wellenlängen erfolgen rechnergesteuert, unterliegen jedoch zu jedem Zeitpunkt der interaktiven Kontrolle des behandelnden Arztes. Die tomographische und endoskopische Bildinformation sowie die diagnostische Laserscannerinformation vom Operationsfeld werden aufgearbeitet und auf dem Bildschirm für den Neurochirurgen dargestellt. Ebenso wird angestrebt, den zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden und nach dem Planungsverfahren zu erwartenden Abtragungszustand vergleichend auf dem Bildschirm des Rechners darzustellen.

18.2.4 Eine zukünftige Strategie

Auf der Basis der hier vorgestellten Untersuchungen wollen wir eine Vorschrift für ein „ideales“ neurochirurgisches Lasersystem für eine zukünftige klinische Anwendung entwickeln. Dabei sollen insbesondere die Anforderungen an die Ausgangsleistung des Lasersystems für verschiedene funktionelle und tumortherapeutische chirurgische Eingriffe ermittelt werden. Darüber hin-

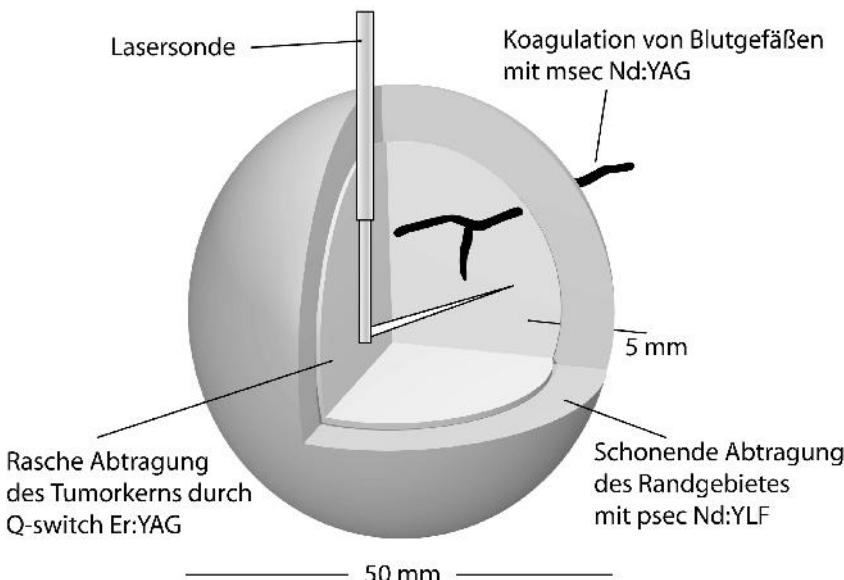


Abb. 18.12. Gesamtstrategie zur Laserabtragung eines Tumors

aus ist geplant, in interdisziplinärer Zusammenarbeit die Frage kontroverser Zielgrößen, maximaler Abtragungsrate und/oder maximaler Gewebeschonung, zu klären. Es wird erwartet, dass lasermedizinische Gerätehersteller für die Abtragung kleinerer Hirngewebevolumina von bis zu 200 mm^3 in absehbarer Zeit Lasersysteme mit äußerst schonender Gewebeabtragung für die klinische Anwendung anbieten können. Für das Abtragen massiver Hirntumoren von bis zu 20 cm^3 könnte sich eine Gerätekonfiguration mit verschiedenen Laserlichtquellen unterschiedlicher Gewebeabtragungscharakteristika als wirtschaftlich erweisen.

Abbildung 18.12 stellt schematisch eine Gesamtstrategie zur Laserabtragung eines Tumors dar. Der Tumorkern wird mit einem kommerziell erhältlichen, hocheffektiven Er:YAG-Laser abgetragen. Die bekannten Koagulations- und thermischen Schädigungseffekte des Er:YAG-Lasers schließen jedoch die Anwendung dieses Lasers im Randbereich des Tumors (etwa 2–5 mm) aus. Für diesen Bereich müssen Laserlichtquellen, wie etwa der Nd:YLF-Laser, zum Einsatz kommen, die Schadenszonen von weniger als $10 \mu\text{m}$ im bestrahlten Gewebe aufweisen. Dies erlaubt eine weitgehende Schonung des gesunden Hirngewebes. Im Ablationsgebiet befindliche Blutgefäße können durch Einkopplung eines thermischen Lasers (z.B. Nd:YAG-Laser) koaguliert und somit verschlossen werden. Anschließend werden sie mit dem ablatierenden Laser abgebaut. Bei größeren Tumoren (ca. 5 cm Durchmesser) ergibt sich durch diese Integration verschiedener Lasertypen in ein System eine entscheidende Beschleunigung des Operationsvorgangs.

18.3 Diagnosesysteme

Die Echtzeitbildgebung erfolgt ebenfalls über die beschriebene Sonde. Während der Operation liefert ein konfokales Mikroskop ein vollständiges Bild der zylinderförmigen Oberfläche des Hirngewebes (s. Abb. 18.10b). Hierbei tastet der Strahl des Diagnoselasers die Hirnoberfläche ab (s. Abb. 18.10d). Die Bildgewinnung ist von großer Bedeutung, da etwaige Blutgefäße, die bei der Ablation freigelegt werden, erkannt und koaguliert werden müssen. Bleibt diese Koagulation aus, so treten Blutungen auf, die schwere Komplikationen bis hin zum Tod des Patienten nach sich ziehen können. Um einen möglichst großen Kontrast zwischen Gefäßen und umgebendem Hirngewebe zu erhalten, kann ein grüner HeNe-Laser verwendet werden, da dessen Wellenlänge dem Absorptionsmaximum des Hämoglobins entspricht. Die Segmentierung der Gefäße erfolgt über digitale Bildverarbeitung. Ein auf morphologischen Operationen basierendes Verfahren, das eine schnelle und sichere Analyse gewährleistet, ist bereits entwickelt und auf ähnlichem Einsatzgebiet, nämlich der Differenzierung von Blutgefäßen in der Netzhaut, erfolgreich eingesetzt worden [10].

In den ersten Ansätzen wird ein Zielvolumen ablatiert, das durch CT und MR ermittelt wurde. Dabei hat man ähnlich wie bei der herkömmlichen Operation das Problem, dass der Rand zwischen Tumor und gesundem Gewebe schlecht zu bestimmen ist. Man muss eine Sicherheitszone mitablatieren, um sicher zu sein, dass der gesamte Tumor entfernt wird. Damit soll ein Rückfall vermieden werden. Speziell im Gehirn ist die Gefahr sehr groß, lebensnotwendige Areale zu beschädigen. Daher wäre eine Möglichkeit zur zuverlässigen Abgrenzung des Tumoreals während der Operation ein großer Fortschritt.

18.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Ein möglicher Ansatz zur Abgrenzung des Tumoreals ist die Diagnose mit Hilfe eines in die Sonde integrierten Fluoreszenzmikroskops. Es soll mit hoher Zuverlässigkeit und Präzision optisch, d.h. nichtinvasiv, die Grenze zwischen gesundem und abzutragendem Tumorgewebe ermitteln. Dies wird jedoch durch die schlechte optische Qualität der Abbildungsoptik erschwert. Es handelt sich um eine niederaperturige Linse ohne optimierte Abbildungseigenschaften. Durch die relativ schlechte optische Qualität der Linse wird die Diagnose erschwert. Es gibt verschiedene Methoden, um unter diesen Voraussetzungen Krebs über Fluoreszenz zu detektieren.

M. Zenzinger et al. [13] konnten mit einem Laboraufbau, der dem optischen Aufbau der Sonde entspricht, zeigen, dass mit der vorgegebenen Optik die Detektion von Krebsgewebe über konfokale Mikroskopie möglich ist. Es wird mit einem Ar^+ -Laser der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und die emitierte Intensität über einen Kantenfilter detektiert. Der konfokale Aufbau in

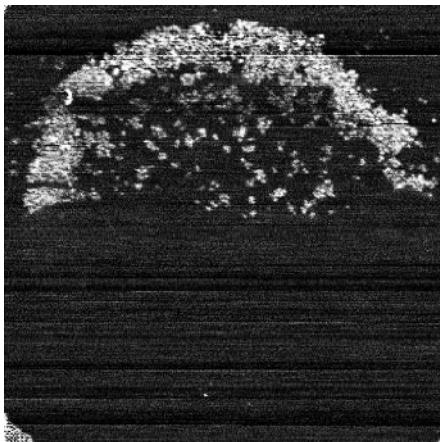


Abb. 18.13. Fluoreszenzbild ($4500 \times 4500 \mu\text{m}$) einer Zellkultur mit halbseitig gebundenem Immunfluoreszenzfarbstoff [13]

Verbindung mit der Fluoreszenz ist nötig, um eine genügend hohe Störunterdrückung zu erreichen. Dabei wurde ein Immunfluoreszenzfarbstoff benutzt. Hierbei bindet ein Antikörper (AB), der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, an ein Antigen der Tumorzelle. Abbildung 18.13 zeigt eine Zellkultur, an der auf der oberen Hälfte der Probe spezifische Immunfluoreszenzfarbstoffe gebunden haben. Areale mit und ohne Farbstoffbindung sind deutlich zu unterscheiden. An geeigneten Antigen–Antikörper-Kombinationen wird geforscht. Als mögliches Antigen kommt das Protein Tenascin in Frage, das nur in neoplastischen aber nicht in normalen Zellen vorkommt [2].

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Stoffen, die sich in der Tumorzelle in Fluoreszenzfarbstoffe umwandeln oder die die Bildung von Fluoreszenzfarbstoffen in der Zelle anregen. Solch ein Farbstoff ist z.B. ALA5 (5-aminolevulinic acid), welcher die Bildung von PpIX (protoporphyrin IX) induziert. Es gibt auch noch Farbstoffe, die sich spezifisch in Tumorzellen anreichern. Ein Grund hierfür kann z.B. der gesteigerte Metabolismus vieler Krebszellen sein. Farbstoffe dieser Art sind i. Allg. jedoch weniger spezifisch als z.B. Immunfluoreszenzfarbstoffe. Zur Zeit wird lediglich die komplette Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung erfasst. Damit ist nur das starke Signal eines exogenen Farbstoffs in hoher Konzentration zu erfassen.

18.3.2 Autofluoreszenz

Das Einbringen körperfremder Stoffe ist allerdings oft mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Daher ist es ein Ziel für die Zukunft, exogene Farbstoffe überflüssig zu machen, indem man endogene, d.h. körpereigene Stoffe für die Detektion verwendet. Endogene Farbstoffe sind für Autofluoreszenz verantwortlich, wenn Übergänge in zelleigenen Molekülen angeregt

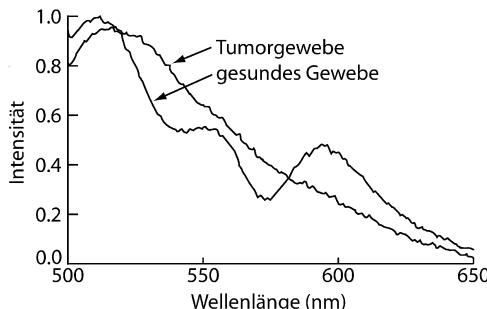


Abb. 18.14. Fluoreszenzspektren von gesundem und kanzerogenem Lungengewebe bei Anregung mit 488 nm [1]

werden. Die Fluoreszenzspektren von gesundem und kanzerogenem Gewebe unterscheiden sich zum Teil deutlich voneinander (Abb. 18.14). Die Anwendung dieser Farbstoffe wäre sicherlich ideal, da keine Fremdsubstanzen mit eventuellen Nebenwirkungen in den Körper eingebracht werden müssen. Der apparative Aufwand erhöht sich jedoch beträchtlich. Es ist jedoch nicht immer möglich, einen geeigneten endogenen Farbstoff für jede Anwendung zu finden. Die meisten verwendeten Farbstoffe sind im Zellgerüst des Gewebes zu finden oder sind am Stoffwechsel der Zellen beteiligt.

Beim Autofluoreszenzverfahren wird es nötig, nicht nur die gesamte Intensität des Fluoreszenzlichts zu bestimmen, sondern auch das Spektrum zu untersuchen, um eine sichere Aussage über die Gewebeart machen zu können. Abbildung 18.14 zeigt exemplarisch Spektren von gesundem und kanzerogenem Lungengewebe. Man sieht, dass sich die Spektren deutlich von einander unterscheiden. Über die unterschiedliche Form der Spektren sollte eine zuverlässige Unterscheidung zwischen gesundem und abzutragenden Gewebe ermöglicht werden. Der apparative Aufwand wird damit natürlich höher, da nicht mehr ein einfacher Photodetektor (Photodiode, Photomultiplier), sondern ein Spektrograph benötigt wird. Dabei muss man einen geeigneten Kompromiss zwischen Auflösung und Empfindlichkeit (s. OCSA, Kap. 18.3.3) finden, da die zur Verfügung stehende Intensität beschränkt ist. Zum einen kann das Gehirn nicht mit beliebigen Intensitäten bestrahlt werden (damit das Gewebe nicht geschädigt wird), und zum anderen lässt die Sondengeometrie (s. Abb. 18.17) nur die Verwendung einer niederaperturigen Optik zu, die nur einen kleinen Teil des Fluoreszenzlichts einfangen kann. Es ist nötig, die Auswertung in Echtzeit durchzuführen, da für jeden angefahrenen Punkt erst das Spektrum analysiert werden muß, um anhand dessen entscheiden zu können, ob dieser Gewebeabschnitt Krebsgewebe ist und abgetragen werden muss. An der Entwicklung geeigneter Spektrometer und der Umsetzung wird derzeit gearbeitet.

18.3.3 OCSA

OCSA steht für *Oligo-Channel Spectrum Analyser*. Da bei unsere Anwendung nur geringe Intensitäten zur Verfügung stehen, müssen Verfahren gefunden werden, die eine möglichst optimale Informationsausbeute ermöglichen. Dazu wird die Anzahl der Kanäle eines Spektrometers so weit verringert, dass gerade noch genug spektrale Information vorliegt, um Tumorgewebe von gesundem zu unterscheiden. Durch die Verringerung der Anzahl der Kanäle wird das zur Verfügung stehende Licht auf weniger Detektoren aufgeteilt. Somit steht pro Kanal eine deutlich höhere Intensität zur Verfügung. In unserem aktuellen Versuchen arbeiten wir mit vier Kanälen (im Vergleich wird das Signal in einem Multichannel Analyser auf 400–600 Kanäle aufgeteilt). Des weiteren können hochempfindliche PMT (Photo Multiplier Tubes) verwendet werden, die eine höhere Empfindlichkeit als CCD aufweisen. Ausgehend von eigenen Voruntersuchungen [5] und Ergebnissen aus der Literatur [1] mit Multichannelgeräten kamen wir zu dem Schluß, dass eine derartige Reduktion zu verwertbaren Diagnosen führen sollte. Die Spektren in Abb. 18.14 zeigen zwar deutliche Unterschiede, die eine Diagnose zuließen; jedoch sind während einer Operation Spektren in dieser Güte schwer zu gewinnen. Zum einen steht für die Aufnahme eines einzelnen Spektrum nur eine sehr kurze Zeit zur Verfügung, da idealerweise jeder Punkt vor der Ablation untersucht wird. Zum anderen sind die optischen Gegebenheiten in der Operationshöhle alles andere als ideal (s. Kap. 18.3.4), d.h. es ist mit niedrigeren Intensitäten zu rechnen.

Wie bereits erwähnt wird das Gewebe durch die Sonde mittels eines konfokalen Mikroskops untersucht. Dabei fungiert der OCSA (Abb. 18.15) als Punkt detektor im konfokalen Aufbau. Das Pinhole (PH) dient als Eingang in den OCSA. Eine Linse (L1) parallelisiert den Strahl, der durch das Prisma spektral zerlegt wird. Der Strahl wird in Abhängigkeit von seiner Wellenlänge in verschiedene Richtungen abgelenkt. Linse 2 (L2) fokussiert das Licht in

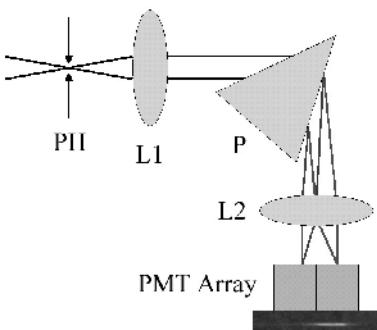


Abb. 18.15. Oligo-Channel Spectrum Analyser

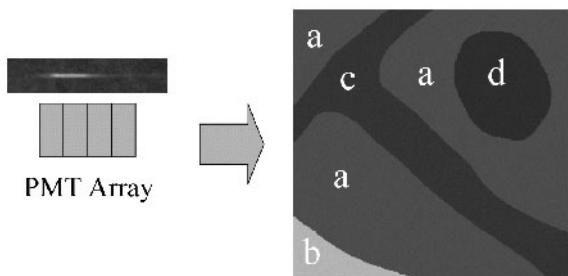


Abb. 18.16. Oligo-Channel Spectrum Analyser

die Detektorebene. Abhängig von der Wellenlänge trifft das Licht auf den entsprechenden Detektor.

Wir können eine begrenzte Anzahl an Photomultipliern aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Geschwindigkeit benutzen. Im Vergleich zu einem videobasierten System sind deutlich höhere Auslesegeschwindigkeiten möglich. Durch den Einsatz mehrerer Kanäle erhält man deutlich mehr Informationen verglichen mit einer reinen Detektion der gesamten Fluoreszenzintensität. Die Daten (Spannungen) werden in einen Computer mittels einer DAQ- (Data-AcQuistion-)Karte eingelesen und dort weiterverarbeitet. Hierzu werden die Intensitätsmuster mit Referenzmustern von Referenzgeweben verglichen und die untersuchte Probe einer (Kombination von) Referenz(en) zugeordnet. Man erhält ein funktionelles Bild (Abb. 18.16), in dem nicht mehr Intensitätsverteilungen sondern Konzentrationen an Referenzgeweben dargestellt werden. Anhand dieser Information wird entschieden was mit dem untersuchten Punkt geschieht (Koagulation, Ablation oder Verbleib). Damit soll eine zuverlässige Ablation des Krebsgewebes bei maximaler Schonung umgebenden Gewebes ermöglicht werden.

18.3.4 Adaptive Optik

Da die Autofluoreszenz von Gehirngewebe recht schwach ist und die Sondengeometrie (Abb. 18.17) die optische Leistung des Gesamtsystems limitiert, wird zur Zeit daran gearbeitet, die Leistung durch den Einsatz der adaptiven Optik zu optimieren. Dieses Verfahren wird bereits seit Jahren in der Astronomie dazu benutzt, atmosphärische Störungen zu kompensieren. Die Wellenfrontverzerrung des auf der Erde ankommenden Lichts wird analysiert und vor der eigentlichen Bildaufnahme korrigiert. Damit ist es möglich, auf der Erde ähnlich gute Bilder wie mit weltraumgestützten Teleskopen zu erhalten. Im Fall der stereotaktischen Laserneurochirurgie strebt man mit diesem Verfahren die Korrektur der Verzerrungen an, die durch die suboptimale Sondenoptik (niederaperturig, niederkorrigiert) und den Durchgang durch Gewebe und Spülflüssigkeit induziert werden. Gewebe und Spülflüssigkeit haben einen inhomogenen Brechungsindex.

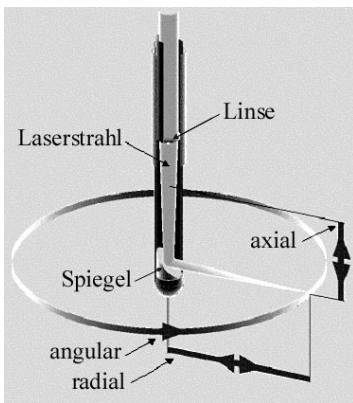


Abb. 18.17. Die Geometrie der Sonde

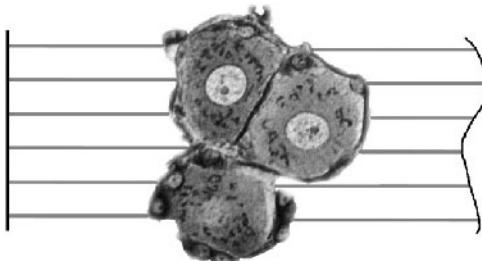


Abb. 18.18. Eine ebene Wellenfront wird beim Durchgang durch ein inhomogenes Medium (Zellhaufen) verzerrt

Sowohl der Ablations- als auch der Diagnoselaserstrahl werden beim Durchlaufen des Gewebes/Spülmediums verzerrt, sodass keine ebene Wellenfront mehr vorliegt (Abb. 18.18). Dies führt zum einen zu einer Verschlechterung des zur Diagnose benötigten Bildes, sodass eine sichere Diagnose erschwert wird. Des weiteren wird der Fokus des Ablationslaserstrahls eines ps- bzw. fs-Lasersystems, der auf einen bestimmten Punkt im Gewebe fokussiert wird, vergrößert. Damit steigt im ungünstigsten Fall die Fokusgröße so weit an, dass die zur Abtragung nötige Leistungsdichte (Plasmaschwelle) im Gewebe nicht erreicht werden kann. Diesen ungünstigen Einflüssen soll durch den Einsatz adaptiver Optik entgegengewirkt werden.

Der prinzipielle Aufbau ist in Abb. 18.19 gezeigt. Das Licht von der Probe wird mit einem Hartmann-Shack-Sensor (HSS) untersucht. Der Hartmann-Shack-Sensor besteht aus einem Array kleiner Linsen, die jeweils einen Teil (Subappertur) der Wellenfront analysieren. Abhängig von dem Winkel, unter dem die Wellenfront auf die Linse zuläuft, verschiebt sich der Fokuspunkt auf der Detektorebene. Diese Abweichung des Punkts von der optischen Achse (Ort des Punkts bei unverkippter ebener Wellenfront) der Linse wird von

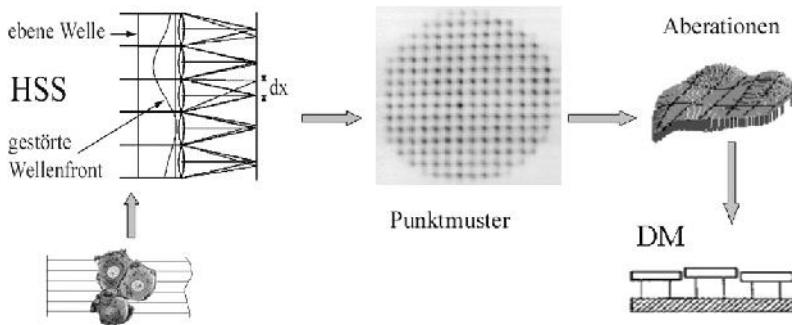


Abb. 18.19. Aufbau eines Closed-Loop-Systems

einer CCD-Kamera in der Fokus-/Detektorebene erfasst. Das Bild (Punktmuster) wird in einen Rechner übertragen. Hier werden aus dem entstandenen Punktmuster (aus Lageabweichungen der einzelnen Punkte im Vergleich zur Null-Lage) die Aberrationen der Wellenfront berechnet. Mit dieser Information steuert man ein aktives Element an wie z.B. einen verformbaren Spiegel (DM, Abb. 18.19) und korrigiert damit die Wellenfront. Diese Korrektur findet fortlaufend im sog. „closed loop“ statt, d.h. wenn ein Zyklus abgeschlossen ist wird sofort mit einem neuen begonnen und etwaige neu aufgetretene Verzerrungen direkt nachkorrigiert. Beim aktiven Element handelt es sich um ein Array aus kleinen, in der Höhe verstellbaren Spiegeln, mit denen der Wellenfront lokal eine Phasenverschiebung aufgeprägt werden kann. Über dieses aktive Element wird der Observationslaser vorkorrigiert ins Gewebe geleitet und das zurücklaufende Licht detektiert. Damit erhält man sowohl einen kleineren beleuchteten Bereich im Gewebe als auch eine ebene rücklaufende Wellenfront und damit eine unverzerrte Abbildung eben jenes Punkts. Dies soll eine nahezu beugungsbegrenzte Auflösung bis in tiefere Schichten sowie eine Erhöhung des Kontrastes ermöglichen.

Die Kontraststeigerung wird sich im Besonderen in der Fluoreszenzmikroskopie positiv auswirken, da hier allgemein nur niedrige Intensitäten zur Verfügung stehen. Der Ablationslaser für die Laserneurochirurgie wird ebenfalls über den deformierbaren Spiegel der adaptiven Optik vorkorrigiert, sodass die adaptive Optik für die Strahlformung des Ablationslasers genutzt werden kann. Der Fokuspunkt des Lasers soll damit verkleinert und so die Qualität der Gewebeabtragung durch die höhere Genauigkeit wesentlich verbessert werden, da die Energie genauer in einem definierten Zielgebiet deponiert werden kann. Abbildung 18.20 zeigt schematisch das Gesamtsystem, wie es typischerweise aussehen könnte. Dabei sind zwei Regelkreise zu sehen. Links (Spektrometer, Spektrum, Laser) wird im Spektrometer das Autofluoreszenzlicht analysiert und über die Zuschaltung des Koagulations-/Ablationslasers entscheiden. In der Mitte des Bildes (HSS, Computer, Aktuator) ist der adaptive Regelkreis zur Strahlformung integriert zu sehen.

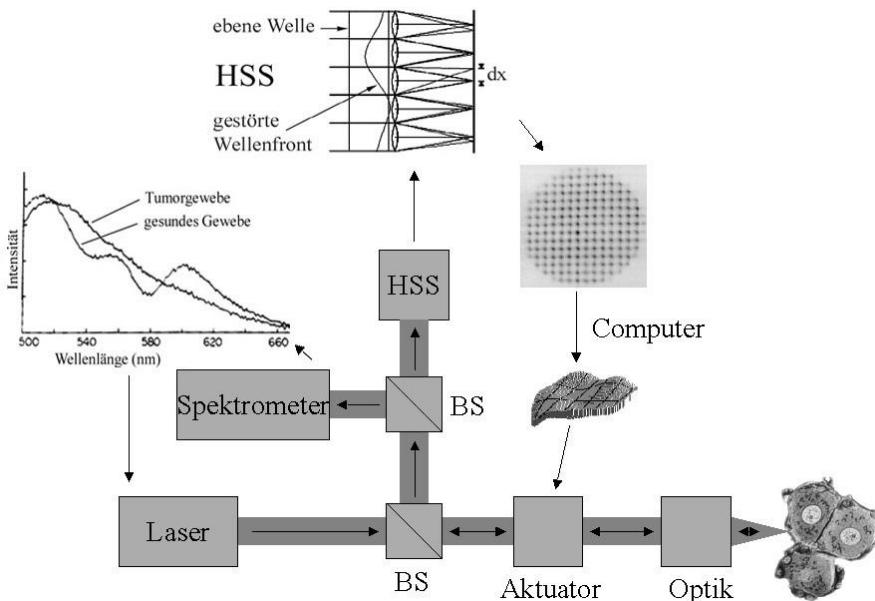


Abb. 18.20. Gesamtsystem zur Laserneurochirurgie mit integrierter Strahlformung über adaptive Optik und Gewebeanalyse durch Autofluoreszenzspektroskopie

Einzelne Komponenten des Systems sind gebaut und getestet. Allerdings ist das Gesamtsystem noch nicht einsatzfähig, sodass noch keine abschließende Beurteilung gegeben werden kann. Die Technik ist nur dann sinnvoll anwendbar, wenn eine Closed-Loop Kompensation in Echtzeit erfolgen kann, da speziell in der Neurochirurgie keine langen Mess- und damit Operationszeiten akzeptiert werden können.

Literatur

1. Alfano RR, Tang G, Pradhan A, Lam W, Cheng D, Opher E (1987) Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissue. *IEEE J Quantum Electr QE-23/10*, pp. 1806–1811
2. Arista A, Sturiale C, Riva P, Tison V, Frattarelli M, Moscatelli G, Franceschi G, Spinelli A (1995) Intralesional administration of I-131 labelled monoclonal antibodies in the treatment of malignant gliomas. *Acta Neurosurg* 135:159
3. Bille JF, Niemz MH (1993) Physik in unserer Zeit 24:109
4. Boulnois J-L (1986) *Lasers Med Sci* 1:47
5. Divkovic G (2001) Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops zur Gewebediagnose. Diplomarbeit, Universität Heidelberg
6. Goetz MH, Fischer SK, Velten A, Bille JF, Sturm V (1999) Computer-guided laser probe for ablation of brain tumors with ultrashort laser pulses. *Phys Med Biol* 44:N119–N127

7. Kelly PJ, Alker GJ Jr, Goerss S (1982) *Neurosurg* 10:324
8. Krause H-J, Daum W (1992) *Appl Phys Lett* 60:2180 (1992); Krause H-J, Daum W (1993) *Physik in unserer Zeit* 24:12
9. Niemz MH, Klanicik EG, Bille JF (1991) *Lasers Surg Med* 11:426
10. Otto T, Ing RO, Burk W, Bille JF, Dengler J (1993) *SPIE Conf on Lasers in Ophthalmology*, Budapest, SPIE-Proc, vol 2079–2016
11. Schlegel W, Sturm V (1991) Computer application systems in radiation therapy and stereotactic neurosurgery. In: Lemke HU (ed) *Meical imaging and computer assisted radiology*. CAR-Tutorial, Technische Universität Berlin, p. 107
12. Walter GF, Ascher PW, Ingolitsch E (1984) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47:745
13. Zenzinger M, Götz MH, Fischer S, Bille J (2000) Confocal fluorescence microscopy for minimal-invasive tumor diagnosis. *Appl Phys B* 70:281–286

19 Anwendungen der Lasertechnik in der Zahnnarztpraxis

T. Pioch

Seit einigen Jahren wird insbesondere in der Laienpresse von sensationellen Erfolgen mit Zahnnarztlasern berichtet. Wenn man den Angaben der Autoren glaubt, dann können Laser den Bohrer ersetzen um Karies zu entfernen, „Parodontose verdampfen“, Zahnwurzeln sterilisieren, schmerzloses Behandeln ermöglichen usw. Das Resultat sind Patienten, die ihren Zahnnarzt mit utopischen Ansprüchen oder unerfüllbaren Wunschvorstellungen aufsuchen. In diesem Beitrag werden die zur Zeit in der Erprobung befindlichen bzw. von der Industrie zum Verkauf angebotenen Lasersysteme vorgestellt. Dabei soll die Wechselwirkung des Laserlichts mit den Zahnsubstanzen verdeutlicht werden. Die Problematik der praxisgerechten Laseranwendung insbesondere hinsichtlich einer Bearbeitung von Zahnhartsubstanzen und Zukunftsaussichten dieser Technik werden diskutiert.

19.1 Softlaser und Hardlaser

19.1.1 Softlaser

In der letzten Zeit finden sog. *Softlaser* mit niedrigen Leistungsdaten (z.B. 2 mW für HeNe-Laser) zunehmend Verwendung. Sie sollen u.a. den Heilungsverlauf bei Entzündungen oder nach operativen Eingriffen beschleunigen, indem das entsprechende Gewebe punktuell oder in rasternden Bewegungen bestrahlt wird. Zudem soll das Laserlicht schmerzlindernd wirken. Zum Einsatz kommen hier insbesondere HeNe-Laser mit rotem Licht bei einer Wellenlänge von 633 nm, aber auch Laserdioden im Infrarotbereich. Dass gerade das Laserlicht im Vergleich zu konventionellen Lichtquellen die genannten Biostimulationen in besonderem Maß bewirken soll, lässt sich in kontrollierten wissenschaftlichen Untersuchungen nicht belegen. Auch in anderen Bereichen der Medizin werden Softlaser eingesetzt und getestet, ohne einen überzeugenden Beweis einer objektivierbaren Biostimulation zu liefern. Die Erfolgsmeldungen über Softlaser in diversen Veröffentlichungen sind oft mit erheblichen Mängeln im methodisch-wissenschaftlichen Vorgehen der Autoren gepaart, Placeboeffekte sind dabei nicht auszuschließen.

19.1.2 Hardlaser

Hardlaser zeigen dagegen aufgrund hoher Leistungsdaten (z.B. 1 W Er:YAG-Laser im Pulsbetrieb) sofortige, sichtbare Wechselwirkungen mit Geweben.

So „schneidet“ beispielsweise der kontinuierliche Strahl des CO₂-Lasers Weichgewebe bei relativ geringem Blutverlust. Eine Anwendung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ist z.B. die Exzision (Herausschneiden) bestimmter Mundschleimhauttumoren.

Bereits 1964 wurden Laser zum Abtragen von kariösen Zahnhartsubstanzen erprobt. Die damaligen Ergebnisse waren aber nur sehr unbefriedigend. Mit fortschreitender Entwicklung der Lasertechnologie gelangten immer leistungsstärkere und auch gepulste Laser zur Kariesentfernung mit fraglichem Erfolg zur Anwendung. Seit wenigen Jahren werden Geräte zur Bearbeitung der Zahnhartsubstanz von der Industrie an Zahnärzte angeboten, wobei bisher angeblich etwa 500 „Dentallaser“ in Deutschland verkauft wurden.

19.2 Anwendungsobjekt Zahn

Der menschliche Zahn besteht im Wesentlichen aus dem äußerlich sichtbaren Zahnschmelz, dem darunter liegenden Dentin (Zahnbein) und der Pulpa (Zahnmark). Eine schematische Darstellung eines Zahnschnittes zeigt Abb. 19.1. Der Schmelz ist die härteste Substanz des menschlichen Körpers und besteht zu 95 Gew.% aus Hydroxylapatit mit der Summenformel Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, weiteren 4% Wasser und 1% organischen Bestandteilen.

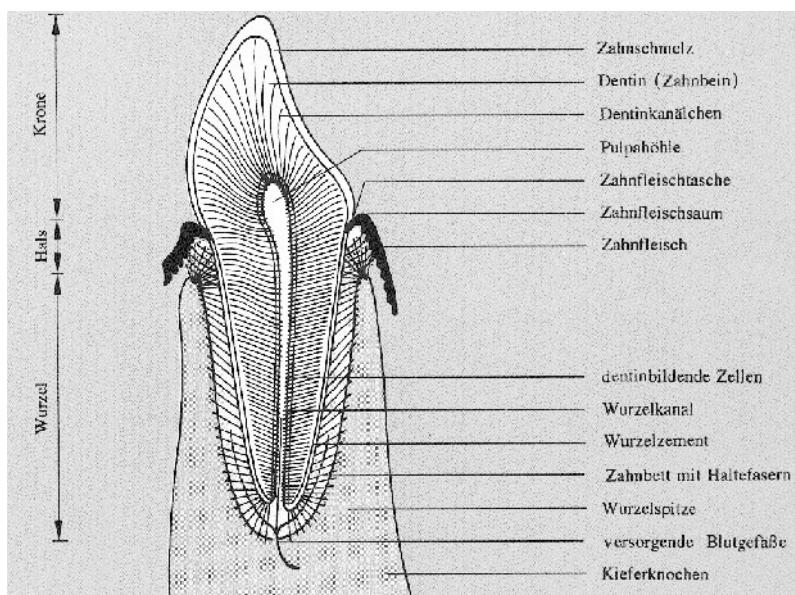
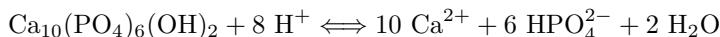


Abb. 19.1. Schematische Darstellung eines Zahns und seines Zahnbetts mit Kieferknochen [32]

Die anorganische Komponente ist mineralisiert und besteht aus nadelförmigen Kristalliten mit Abmessungen von ca. $25 \times 40 \times 160 \text{ nm}^3$. Diese Kristallite organisieren sich zu Schmelzprismen, deren mittlerer Durchmesser etwa $4\text{--}6 \mu\text{m}$ beträgt und deren Länge im Millimeterbereich liegt. Das Kristallgitter ist erheblich durch „Verunreinigungen“ von CO_3^{2-} , Cl^- , F^- , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ und weiteren Spurenelementen gestört. Die hydratisierte organische Komponente dient als „Lückenfüller“ und trägt u.a. zur Stabilität des Systems bei. Das Dentin ist nur noch zu 70 Gew.% mineralisiert, 20% sind Kollagenfasern (organische Bestandteile), und 10% sind Wasser. Charakteristisch für das Dentin sind feine, geradlinige Kanälchen mit Durchmessern zwischen wenigen 100 nm und etwa $3 \mu\text{m}$, bei Kanallängen bis ca. 5 mm. Die Pulpa ist nicht mineralisiert. Hier befinden sich u.a. die Odontoblasten (dentinbildende Zellen), Pulpafibroblasten (Bindegewebszellen), Blutgefäße und Nervenfasern.

Die Karies (Zahnfäule) entsteht bei kariogener Ernährung und unzureichender Mundhygiene. Dabei siedeln sich Mikroorganismen als Zahnpulpa auf den Zahnoberflächen an und produzieren insbesondere Milchsäure und Essigsäure mit Absenkungen des pH-Wertes bis auf ca. 3,5. Aufgrund eines Zusammenhangs zwischen der Löslichkeit von Hydroxyapatit und pH-Wert,



kann es innerhalb von wenigen Tagen zur Demineralisation („Entkalkung“) des Zahnschmelzes kommen. Dieser Prozess wird als Karies bezeichnet. Im initialen Stadium erfolgt der Mineralverlust zunächst unterhalb einer ansonsten intakten Oberflächenschicht, und es werden weiße Flecken sichtbar. Im fortgeschrittenen Stadium geht der Kariesprozess oft mit dunklen Verfärbungen einher. Bei tiefgehender Karies nach Einbruch der intakten Oberflächenschicht finden Mikroorganismen eine ökologische Nische. Dabei kann auch das Dentin entmineralisiert werden und Mikroorganismen können die Pulpa infizieren. Im Fall einer fortgeschrittenen Karies, die bekanntermaßen häufig mit Schmerzen verbunden ist, kann der Zahnarzt nur durch Entfernen der erkrankten Zahnhartsubstanz und Auffüllen mit geeigneten Restaurationswerkstoffen (z.B. Amalgam, Gold, Keramik oder Kompositmaterialien) abhelfen. Das konventionelle Entfernen der Karies im Schmelz erfolgt mit rotierenden oder oscillierenden Instrumenten, die im Volksmund als „Bohren“ bezeichnet werden. Im engeren Sinne handelt es sich übrigens in den meisten Fällen nicht um ein „Bohren“, sondern um ein „Schleifen“ oder „Fräsen“. Im Folgenden wird aber der umgangssprachliche Begriff „Bohren“ beibehalten. Das ändert aber auch nichts an der Tatsache, dass mit dem „Bohren“ unangenehme Empfindungen oder gar heftige Schmerzen verbunden sind. In diesem Punkt wird vom Laser der entscheidende Vorteil gegenüber dem konventionellen Verfahren erwartet: er soll weniger oder gar keine Schmerzen verursachen.

Im Gegensatz zum Laserschneiden an Weichgeweben sind am Zahn rein thermische Effekte unerwünscht. Eine Erwärmung des Zahns um bis zu 5°C

ist für das Pulpagewebe noch tolerabel [36]. Doch die meisten Lasersysteme würden den Zahn bei der Kariesentfernung derart überhitzen, dass es zu irreversiblen Schäden käme, mit der unerwünschten Folge heftiger Schmerzen und eines Zahns mit avitalem (abgestorbenen) Zahnmark.

19.3 Wechselwirkungen mit Zahnhartsubstanzen

Voraussetzung für eine Wechselwirkung des Laserlichts mit der Zahnhartsubstanz ist eine entsprechende Absorption. Das Absorptionsspektrum von Zahnschmelz zeigt deutliche Maxima für Wellenlängen von $3,0\text{ }\mu\text{m}$ und $9,6\text{ }\mu\text{m}$. Für das Absorptionsmaximum bei $3,0\text{ }\mu\text{m}$ ist Wasser verantwortlich, bei $9,6\text{ }\mu\text{m}$ absorbiert Hydroxylapatit. Laserlicht mit einer Wellenlänge im Bereich eines Absorptionsmaximums hat demzufolge Eindringtiefen von nur wenigen μm (Lambert-Beer-Gesetz). Damit ist die eingestrahlte Leistung auf ein kleines Probenvolumen konzentriert. Strahlung bei Wellenlängen, die vom Absorptionsmaximum erheblich abweichen, gelangt mehrere mm tief in den Zahn und kann die sensible Pulpa zerstören.

In Abhängigkeit von den physikalischen Eigenschaften des Lasers wie

- Wellenlänge,
- Emissionsform (Impulsbetrieb oder Dauerstrichbetrieb),
- mittlere Leistung,
- Strahlungsenergie pro Puls,
- Pulslänge,
- Pulswiederholfrequenz,
- Energieflossdichte,
- Leistungsflussdichte,
- Bestrahlungsquerschnitt

werden unterschiedliche Wechselwirkungen beobachtet und in vier Gruppen unterteilt [4,13]:

1. photothermische-, thermomechanische Wirkung,
2. photochemische Wirkung,
3. photoablative Wirkung und
4. photodisruptive Wirkung.

Bezogen auf bestimmte Lasersysteme werden unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen auch Kombinationen der hier differenzierten Wechselwirkungen beobachtet.

19.3.1 Photothermische-, thermomechanische Wirkung

Bei der Absorption des Laserlichts regt ein Teil der Strahlungsenergie die Moleküle des Absorptionsmediums zu Vibrationsschwingungen an und wird somit in Wärmeenergie umgewandelt. Ein weiterer Teil der Strahlungsenergie

kann chemische Veränderungen bewirken (s. Kap. 19.3.2). Photothermische Wirkungen konzentrieren sich initial nur auf das Absorptionsvolumen. Bei hoher Absorption im Zahnschmelz ist dieses Volumen klein. Dies wird z.B. beim CO₂-Laser mit seiner Wellenlänge von 9,6 µm beobachtet. Durch Wärmediffusion verteilt sich anschließend die Wärmeenergie. Bei überschreiten des Siedepunkts von Wasser trocknet die Zahnhartsubstanz schnell aus. Weitere Temperaturerhöhungen führen insbesondere zu chemischen Veränderungen; so sind z.B. bei den kohlenstoffhaltigen Geweben oder am Dentin Karbonisierungen mit schwarzen Verfärbungen zu beobachten. Selbst ein Schmelzen und Verdampfen des Zahnminerals ist möglich. Bei Anwendung eines Er:YAG-Lasers sind thermomechanische Effekte dominierend, da die Wellenlänge des Er:YAG-Lasers von 2,94 µm mit dem Absorptionsmaximum von Wasser übereinstimmt. Ein schlagartiges Verdampfen des in der Zahnhartsubstanz befindlichen Wassers führt im Fokus des Laserlichts zu Mikroexplosionen, bei denen das umgebende Material zertrümmert und herausgeschlagen wird.

19.3.2 Photochemische Wirkung

Alle bekannten Lasersysteme lösen mehr oder weniger ausgeprägte photochemische Prozesse aus. Auch den umstrittenen Softlasern muss man eine derartige Wirkung zugestehen. Die Absorption in der Elektronenhülle der Atome der Zahnhartsubstanzen kann bei ausreichender Photonenenergie chemische Bindungen auftrennen (Photodissoziation), wobei Radikale entstehen. Die chemische Reaktion der Radikale untereinander erlaubt weiterhin die Bildung von Isomeren (Photoisomerierung). Eine häufig anzutreffende Variante ist die Ionisierung von Molekülen (Photoionisierung). Bei geringer Photonenenergie ist zumindest eine Anregung der Moleküle in höhere Elektronenzustände möglich.

19.3.3 Photoablativ Wirkung

Die Auftrennung z.B. eines Wassermoleküls in seine Ionen H⁺ und OH⁻ erfordert eine Energie von 5,18 eV. Diese Energieschwelle wird von den Photonen der meisten Lasersysteme (Ausnahme: ArF-Excimerlaser) nicht überschritten. Durch Pulskomprimierung zu Pulslängen unter 1 µs und Leistungsdichten von mehr als ca. 10⁷ W/cm² können aber mehrere Photonen von einem Molekül zur Ionisierung absorbiert werden. Somit erfolgt bei derartigen Lasern die Umsetzung der Strahlungsenergie weniger in Wärme, sondern mehr in massive Molekülzerlegungen mit anschließender, explosionsartiger Zerstörung des Materials. Bei diesem als „Photoablation“ bezeichneten Prozess werden weiterhin nichtabsorbierte Laserenergien mit der plötzlichen Volumenexpansion verbraucht, sodass photothermische Wirkungen von untergeordneter Bedeutung sind.

19.3.4 Photodisruptive Wirkung

Für sehr kurze Laserpulse im Pikosekundenbereich und hohen Energiedichten entsteht im Fokus des Laserlichts ein Mikroplasma mit Temperaturen größer als 10 000 K. Hierzu sind Leistungsflussdichten über 10^{11} W/cm^2 notwendig. Der enorme Volumenbedarf des Plasmas führt zu Druckgradienten bis zu einigen 100 kbar. Die dabei entstehende Schockwelle breitet sich mit einer Geschwindigkeit aus, die oberhalb der jeweiligen Schallgeschwindigkeit liegen kann. Dabei kommt es zu lokalen Zertrümmerungen der Zahnhartsubstanz. Das Plasma hat eine sehr hohe Absorption für das unmittelbar nachfolgende Laserlicht, auch wenn die Wellenlänge der Strahlung nicht mit einem Absorptionsmaximum des Zahnschmelzes übereinstimmt. Somit ist die Wellenlänge des angewendeten Laserlichts in diesem Fall von untergeordneter Bedeutung. Die Absorption für den Zeitraum der Impulsdauer verhält sich nicht linear. Photodisruptive Wirkungen können aber auch an Übergängen wie z.B. Schmelz-Dentin oder Dentin-Pulpa durch teilweises Reflektieren der Schockwelle unerwünschte Zerstörungen beinhalten. Pikosekundenlaser werden in der Lithotripsie zur Zertrümmerung von Harnsteinen und Gallensteinen verwendet. Die Wirkungen auf dem Gebiet der Zahnheilkunde sind aber noch weitgehend unerforscht.

19.4 In Erprobung befindliche Lasersysteme für die Bearbeitung von Zahnhartsubstanzen

Die Tabelle 19.1 gibt eine Übersicht über die in der Zahnheilkunde in Erprobung befindlichen Lasersysteme. Voraussetzung für ein optimales Laser-System sind Abtragungsraten, die die Entfernung von kariösem Zahnmateriel in realistischen Zeiträumen ermöglichen. Weiterhin dürfen keine Sekundär-schädigungen z.B. der Mundschleimhaut durch Streustrahlung usw. auftreten. Das Tragen einer Schutzbrille ist für den Patienten und den behandelnden Zahnarzt notwendig. Die Wärmebelastung der Pulpa darf nicht über 43°C betragen, da sonst Gewebsschäden bzw. Schmerzen bei der Behandlung auftreten [20, 36].

Unter der Voraussetzung, dass die Pulpa bei Laserbestrahlung nicht thermisch geschädigt werden soll, lassen sich bereits alle kontinuierlich strahlenden Systeme (cw-Systeme) für eine sinnvolle Behandlung der Zahnhartsubstanzen ausschließen, da zwangsläufig nichtakzeptable Wärmeentwicklungen auftreten. Eine besondere Rolle bei der Suche nach dem geeigneten Lasersystem spielen somit die gepulsten Laser.

Bei der Handhabung von Hardlasern hat sich allgemein der Einsatz eines leistungsschwachen und kontinuierlich strahlenden Pilotlasers im Strahlengang als vorteilhaft erwiesen. Dazu kommen z.B. HeNe-Laser mit dem sichtbaren Rotlicht bei 633 nm zur Anwendung. Ein solcher Pilotlaser markiert die Position, auf die der Hardlaser z.B. bei Betätigung eines Fusspedals einstrahlt. Über einen stark astigmatisch eingestellten Pilotlaser kann darüber

Tabelle 19.1. Zusammenstellung einiger für zahnmedizinische Anwendungen in Erprobung befindlicher Lasersysteme

Lasermedium	max. Leistung bzw. Energie	Pulslänge	Wellenlänge
CO ₂	1000 W	cw (kontinuierlich)	10,6 µm
CO ₂	1000 mJ/Puls	100 ns–10 µs	10,6 µm
Er:YAG	1000 mJ/Puls	100 ns–250 µs	2,94 µm
Ho:YAG	800 mJ/Puls	100 ns–350 µs	2,06 µm
Nd:YAG	1000 mJ/Puls	100 ns–250 µs	1,064 µm
Nd:YLF	1 mJ/Puls	14 ps (Modenkopplung)	1,053 µm
Ti:Saphir	1 mJ/Puls	100 fs–2 ps	780 nm
Rubin	1000 mJ/Puls	100 ns–250 µs	694 nm
HeNe	25 mW	cw	633 nm
Farbstoff	3 W	cw	450–900 nm
Argon-Ionen	20 W	cw	488, 514 nm
XeF-Excimer	50 mJ/Puls	20 ns	351 nm
XeCl-Excimer	300 mJ/Puls	20–300 ns	308 nm
KrF-Excimer	1000 mJ/Puls	20–40 ns	248 nm
ArF-Excimer	800 mJ/Puls	10–20 ns	193 nm

hinaus auch bei Variation des Arbeitsabstands auf den Fokus des Hardlasers manuell vorjustiert werden.

Experimentelle Versuche mit einem gepulsten *Ho:YAG-Laser* (Holmium: Yttrium-Aluminiumoxid-Granat), einem *CO₂-Laser* und einem *Rubinlaser* waren wenig erfolgversprechend aufgrund der scheinbar unüberwindlichen Wärmeentwicklung. In einer Veröffentlichung, in der ein sehr kurz gepulster CO₂-Laser vorgestellt wurde, konnten demgegenüber Abtragungen bei Temperaturerhöhungen unter 6°C erreicht werden, sodass man für dieses Lasersystem die Entwicklung weiter beobachten muss [25]. Neben Pulpnekrosen sind auch thermisch bedingte Risse im Zahnschmelz zu befürchten. In Abb. 19.2 sind drei dieser Risse mit Ausdehnungen von mehreren 100 µm im Rasterelektronenmikroskop (REM) sichtbar. Darüber hinaus treten auch vermehrt Mikrorisse im Bereich der Kavitätewand auf (s. Abb. 19.2).

Der erste für ablative Anwendungen auf dem Markt erhältliche Laser war ein gepulster *Nd:YAG-Laser* (Nd:Yttrium-Aluminiumoxid-Granat) einer amerikanischen Gesellschaft. Bei einer Impulswiederholfrequenz von wenigen Hz entsteht ein nicht zu überhörendes Knattergeräusch. Die anfangs in den Prospektien hochgelobte Leistungsvielfalt beinhaltete auch, dass dieser Laser Karies entfernen könnte. Als problematisch stellte sich hierbei allerdings die Temperaturerhöhung heraus. Bereits nach einer Bestrahlungszeit von 100 s stieg die Temperatur des Zahns im Bereich der Pulpa um mehr als 40°C an [11]. Dies ist auf die ausgesprochen ungünstige Wellenlänge im nahen Infrarotbereich zurückzuführen, denn bei 1,064 µm ist die Absorp-

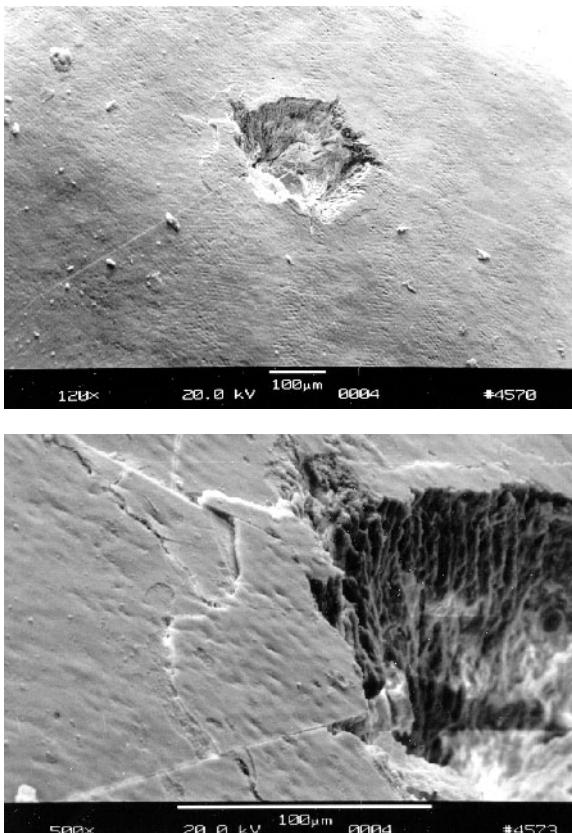


Abb. 19.2. Oben: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer Kaviät im Zahnschmelz. Durch thermische Effekte entstanden drei sichtbare Risse. Ho:YAG, 350 mJ/Puls, 1 Hz, 20 Pulse je 300 μ s. Unten: Teilvergrößerung aus der oberen Abbildung. Zusätzlich sind Mikrorisse am Kavitätenrand erkennbar

tion der Infrarotstrahlung im Zahn sehr gering bzw. das Absorptionsvolumen groß. Außerdem ist die zu investierende Zeit, um eine Zahnkavität zu erzeugen, um ein Vielfaches größer als bei Verwendung des konventionellen Bohrers. Somit reduzieren sich die realistischen Anwendungsmöglichkeiten des Nd:YAG-Systems erheblich.

Mit der sehr viel günstigeren Wellenlänge von 2,940 μ m ist auch ein gepulster *Er:YAG-Laser* (Er:Yttrium-Aluminiumoxid-Granat) auf dem Markt erhältlich. Die Ablationsraten sind gegenüber dem Nd:YAG-Laser wesentlich höher, wobei die Temperaturbelastung akzeptable Werte annimmt [18, 20]. Klinischen Ergebnissen zufolge soll das Pulpagewebe eine Kavitätenpräparation mit dem Er:YAG-Laser problemlos vertragen, wobei zusätzlich von geringen Schmerzempfindungen berichtet wurde [22]. Etwas nachteilig ist bei diesem System die Tatsache, dass eine Glasfaser für den Transport der

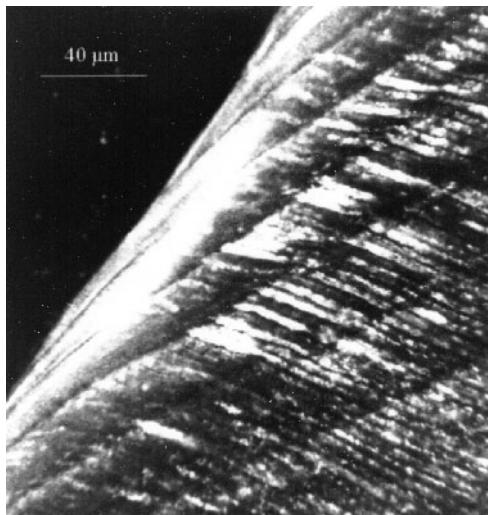


Abb. 19.3. Darstellung von Zahnschmelz im Querschnitt mit einem konfokalen Laserrastermikroskop. Die Retzius-Parallelstreifen treffen im spitzen Winkel auf die Zahnoberfläche. Bei den zahlreichen Strukturen, die senkrecht dazu zwischen Streifen verlaufen, handelt es sich um Schmelzprismen

Laserenergie nicht verwendet werden kann. Glas und auch weitere bekannte Medien absorbieren bei dieser Wellenlänge erheblich, sodass man auf aufwendige Spiegelsysteme mit mehreren Gelenken angewiesen ist. Ein weiterer Nachteil liegt in der z.T. inhomogenen Verteilung des Absorptionsmediums Wasser im Zahnschmelz. Insbesondere im Bereich der Zahnseitenflächen existieren wasserreiche Schichten, die die Oberfläche des Zahns im spitzen Winkel erreichen. Histologisch ist dieses Strukturmerkmal als Linienschar darstellbar und unter der Bezeichnung „Retzius-Streifen“ bekannt (Abb. 19.3). Die thermomechanische Wirkung durch das explosionsartig verdampfende Wasser erfolgt daher in diesem Bereich räumlich unkontrolliert, was Abplatzungen an den Kavitätenrändern zur Folge hat (Abb. 19.4). Da für manche Füllungsmaterialien scharfkantige Kavitätenränder erforderlich sind, ist der klassische Bohrer in der Bearbeitungsexaktheit diesbezüglich überlegen. Mit entsprechenden computergesteuerten Systemen sollen sich aber derartige Rauhtiefen minimieren lassen [3]. Bei einer Pulswiederholfrequenz zwischen 1 und 4 Hz sind auch beim Er:YAG-System Knattergeräusche vorhanden.

Die im Versuchsstadium befindlichen *Excimerlaser* (*excited dimer*) liefern Licht bei Wellenlängen im sichtbaren blauen bzw. im nahen UV-Bereich. Die Applikation auf Zahnhartsubstanzen bewirkt eine vergleichsweise geringe Abtragung, wobei sich die verbleibende Kavitätenwand in einer Schichtdicke von ca. 1 µm glasartig darstellt [27]. Die Temperaturbelastung der Pulpa ist nach Aussage einiger Autoren unbedenklich. Für den Excimerlaser spricht aber eine Möglichkeit der *selektiven* Kariesabtragung aufgrund seiner ver-

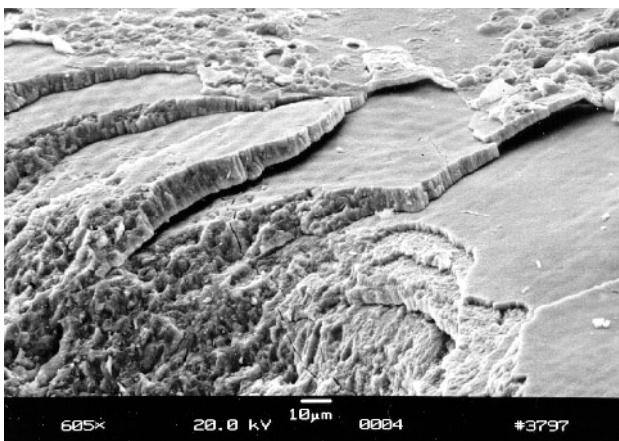


Abb. 19.4. Aufgrund inhomogener Wasserverteilung im Schmelz entsprechend der Retzius-Parallelstreifen ist die Kavitätenwand schichtweise abgeplattzt. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung (Er:YAG, 100 mJ/Puls, 1 Hz, 20 Pulse je 90 μ s)

gleichsweise kurzen Wellenlänge und der dadurch entstehenden Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich. Dabei wird das Fluoreszenzspektrum nach jedem Laserimpuls von einem entsprechenden Spektrometer detektiert und ausgewertet. In Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Spektren von kariösem Schmelz und gesundem Schmelz unterscheiden [12]. Nach elektronischer Auswertung der Spektren mit den Entscheidungsmöglichkeiten „kariös“ oder „gesund“ könnte z.B. die Impulswiederholfrequenz gesteuert werden, um eine hochgradig selektive Kariesentfernung zu erreichen. Derartige „intelligenten Systeme“ werden aber in einem preislichen Rahmen liegen, der die Anschaffung für den niedergelassenen Zahnarzt kaum noch rechtfertigen dürfte.

Mit dem Bekanntwerden immer neuerer laseraktiver Materialien sind weitere zukünftige Erfolge zu erwarten. So wird z.B. auch ein *Nd:YLF-Laser* (Nd:Yttrium-Lithium-Fluorid) erprobt, der in sog. Modenkopplung bei Pulslängen von 14–60 ps arbeitet [29, 30, 50]. Dabei sind Pulswiederholfrequenzen um 1 kHz bei Energieflussdichten von mehr als 10^{12} W/cm² möglich. Für die Abtragung von Zahnschmelz zeigte dieses System vergleichsweise gute Abtragungsraten mit Sublimationen des Plasmas an den Wänden tieferer Kavitäten [32, 35] (Abb. 19.5, 19.6). Doch solange nicht alle Nebeneffekte, wie mögliche zerstörende Einwirkungen der Schockwelle auf den Schmelz-Dentin-Übergang untersucht und für klinisch unbedenklich befunden sind, ist der Einsatz dieses Systems am Menschen ausgeschlossen.

Mit einem *Ti:Saphir-Laser*, der Impulslängen von 100–2000 fs erzeugt, konnten ebenso Ablationen im Schmelz und im Dentin durchgeführt werden, wobei die Temperaturbelastung gegenüber den Pikosekundenimpulsen des Nd:YLF-Lasers noch geringer zu sein scheint [24].

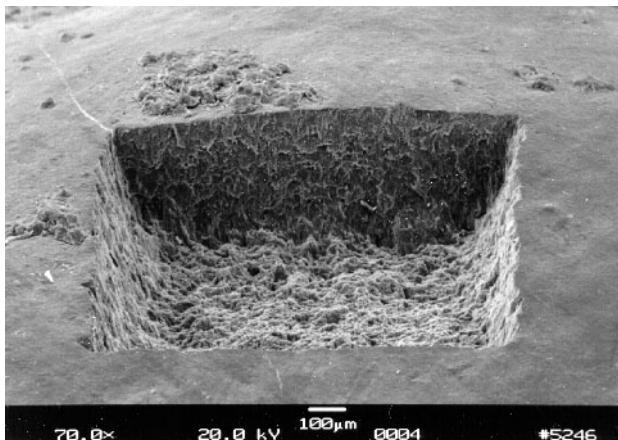


Abb. 19.5. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer Kavität im Zahnschmelz (Nd:YLF, 30 ps, 160 000 Pulse je 1 mJ, 400 Hz)

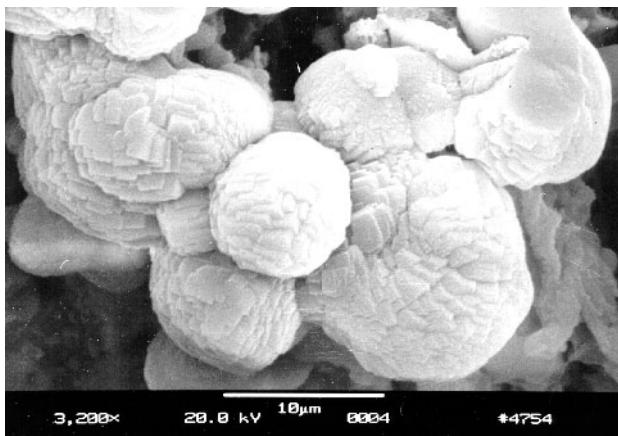


Abb. 19.6. In der Kavitätentiefe (> 2 mm) sind die Wände perlenartig benetzt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Plasmasublimationen (Nd:YLF)

19.5 Laseranwendungen in verschiedenen Bereichen der Zahnheilkunde

19.5.1 Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Bei chirurgischen Eingriffen kann der Nd:YAG-Laser Anwendung finden, wenn es gilt, den thermisch induzierten, koagulativen Effekt auszunutzen. Dies ist z.B. bei Zahnextraktionen der Fall, wenn die Gefahr einer starken Nachblutung besteht. Bei bösartigen (malignen) Tumoren nutzt man die thermische Wirkung des CO₂- oder des Nd:YAG-Lasers, um Gewebe zu koagu-

lieren und gleichzeitig durch die entstehenden thermisch bedingten Nekrosezonen im Randbereich einen Sicherheitsabstand zu schaffen. Beim Herausschneiden (Exzision) von Mundschleimhautveränderungen, insbesondere von Leukoplakien, wird mitunter der CO₂-Laser eingesetzt [10, 17]. Dabei wird von geringeren postoperativen Schmerzen berichtet [8]. Bei der Behandlung von Patienten mit Blutgerinnungsstörungen wird der Einsatz eines Nd:YAG-Lasers zur intraalveolären Koagulation empfohlen. Dabei soll eine thermische Schädigung benachbarter anatomischer Strukturen vermieden werden [7].

19.5.2 Parodontologie

Die Parodontologie beschäftigt sich mit den Erkrankungen des Zahnhalteapparates. Dieses Gebiet der Zahnheilkunde hat in den vergangenen Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen. Ursache für Parodontopathien sind bestimmte Mikroorganismen, die sich auf den Zahnoberflächen ansiedeln und dort einen Belag, die sog. mikrobielle Plaque bilden. Diese Plaque sollte im Rahmen der häuslichen Mundhygienemassnahmen möglichst regelmäßig entfernt werden. Wenn die Plaqueentfernung nicht ausreichend erfolgt, können unter bestimmten Voraussetzungen Zahnfleischentzündungen entstehen, die sich je nach Ausmaß der Entzündungsreaktion in Schwellung, Rötung, erhöhter Blutungsneigung und Taschenbildung äußert. Auf dem Boden dieser Entzündungen kann auch ein Abbau des knöchernen Zahnfachs eintreten. Im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium werden die Zähne gelockert und sind nur noch eingeschränkt funktionsfähig. Die konventionelle Behandlung umfasst neben der Schulung zu einer möglichst effektiven täglichen Mundhygiene eine sich regelmäßig wiederholende professionelle Reinigung der Zahnoberflächen, wobei neben einer Reduktion der mikrobiellen Plaque manchmal auch oberflächliche Zahnschichten entfernt werden müssen, die mit Zellgiften bakteriellen Ursprungs durchsetzt sind und daher ebenfalls zum Entzündungsprozess beitragen können.

Unter bestimmten Bedingungen sind parodontalchirurgische Eingriffe erforderlich. Dazu gehört u.a. auch die Reinigung der Wurzeloberflächen unterhalb des Zahnfleischs mit Hilfe von scharfkantigen Instrumenten (sog. Kürettten). Über eine dünne Glasfaser, die in die Zahnfleischtasche (Spalt zwischen Zahnfleisch und Zahn) eingeschoben wird, könnte auch das Laserlicht zur Keimreduktion auf den Wurzeloberflächen genutzt werden [15, 28]. Gegenüber der konventionellen Methode, die zwangsläufig mit geringfügigen Verletzungen der Weichgewebe einhergeht, kann der Laser zwar unblutiger arbeiten, eine komplette Reinigung der Zahnoberflächen ist mit Laserlicht jedoch nicht zu erzielen. Nachbehandlungen mit mechanischen Werkzeugen sind daher unumgänglich [21]. Zu Effektivität und Nebenwirkungen des Laserlichts in diesen Bereichen liegen noch keine ausreichende Daten vor. Von einer diesbezüglichen Anwendung an Patienten muss derzeit abgeraten werden.

Für bestimmte parodontalchirurgische Eingriffe ist der Einsatz eines CO₂-Lasers denkbar. Dazu gehören u.a. das Durchtrennen von Bändchen, Gin-

givektomien (Abtragungen des Zahnfleischrandes) und Vorbereitungen eines Empfängerbetts für freie Schleimhauttransplantate. Aufgrund des höheren Aufwandes durch den Einsatz eines Lasers ergeben sich dabei allerdings kaum Vorteile gegenüber konventionellen Verfahren [48]. In einigen klinischen Versuchen, in denen der CO₂-Laser als Ersatz zum Skalpell herangezogen wurde, konnte festgestellt werden, dass bei Lasereinsatz postoperativ geringere Schwellungen und Schmerzen eintraten [14, 42] als bei Schnittführungen mit dem Skalpell. Ein weiterer möglicher Vorteil ist die im Vergleich zu konventionellen Verfahren geringere Blutungsneigung des Zahnfleischs während der Operationen.

19.5.3 Zahnüberempfindlichkeiten

Zahnüberempfindlichkeiten treten besonders an den Zahnhälsen auf, da hier der schützende Zementmantel sehr dünn ist oder sogar ganz fehlen kann, sodass das Zahnbein (Dentin) mit seinen vielen zum Zahnmark (Pulpa) hinverlaufenden Kanälchen den mannigfaltigen Einflüssen der Mundhöhle direkt ausgesetzt ist. Überempfindlichkeiten von Zähnen werden heute in erster Linie durch Beeinflussung der auslösenden Faktoren behandelt. Diese können z.B. in falschen Zahnpflegetechniken oder zu aggressiven Zahnpasten zu suchen sein. Auch bestimmte Ernährungsgewohnheiten (z.B. langandauernder Genuss stark erosiver, säurehaltiger Nahrungs- und Genussmittel) sind nicht selten Ursache für derartige Probleme. Falls nach Umstellung zu einer richtigen Zahnpflege und einer weniger erosiven Ernährung immer noch Überempfindlichkeiten auftreten, besteht heute die Möglichkeit, mit Kunststoffmaterialien, die auf die Zahnoberfläche auch in dünnen Schichten aufgeklebt werden können, eine sehr effektive und gleichzeitig schonende Behandlung vorzunehmen.

Laseranwendungen wurden ebenfalls für die Behandlung von Zahnüberempfindlichkeiten erprobt. Mit einigen Lasersystemen strebt man das oberflächliche Verschmelzen der Zahnhartsubstanz an, wobei die Öffnungen der Dentinkanälchen verschlossen werden sollen. Diese Behandlung scheint in einzelnen Fällen wirkungsvoll zu sein [49], muss aber in regelmäßigen Abständen wiederholt werden. Berücksichtigt man das zur Zeit insgesamt verfügbare Spektrum zur Behandlung überempfindlicher Zähne, so ist das Anwendungsgebiet des Lasers hier als eher klein anzusehen.

19.5.4 Endodontologie

Die Pulpahöhle verzängt sich in Richtung Kieferknochen zu einem feinen Wurzelkanal bei Frontzähnen und in bis zu drei (in wenigen Fällen auch vier) Wurzelkanälen bei Backenzähnen. Sie enthält das Pulpagewebe (Zahnmark), bestehend u.a. aus Nervenfasern, Blutgefäßen und Bindegewebsfasern. Insbesondere im Bereich der Wurzelspitze (s. Abb. 19.1) kann eine Vielzahl

von abzweigenden Nebenkanälen vorhanden sein. Falls eine behandlungsbedürftige, irreversible Schädigung der Pulpa vorliegt, trepaniert der Zahnnarzt in der Regel den betroffenen Zahn, indem er die Pulpahöhle mit einem Bohrer freilegt. Das entzündete oder manchmal auch abgestorbene Gewebe wird entfernt. Nach Reinigung und Aufbereitung der Wurzelkanäle mit speziellen Aufbereitungsinstrumenten und Spülflüssigkeiten wird das Kanallumen mit Füllungswerkstoffen abgefüllt. Das Problem besteht u.a. darin, im Wurzelkanal vor der Füllung eine ausreichende Keimreduktion herzustellen. Dies wird durch die sog. chemomechanische Aufbereitung erreicht, wobei neben der mechanischen Abtragung infizierten Materials wiederholt mit antimikrobiell wirksamen Substanzen gespült wird (z.B. mit Natriumhypochlorit). Mit einer sehr dünnen Glasfaser kann aber alternativ oder zumindest unterstützend dazu auch Laserlicht mit einer bakterientötenden Wirkung in den Kanal eingebracht werden. Nachdem Wechselwirkungen mit der Kanalwand im Sinne einer Kanalaufbereitung gezeigt werden konnten [15, 31], ist die Effektivität einer Keimreduktion, insbesondere im Bereich der nur wenigen μm dicken Kanalverzweigungen, umstritten, zumal die derzeit im Handel erhältlichen Glasfasern noch zu große Durchmesser (ca. 200–400 μm) besitzen und damit nicht immer tief genug in den Wurzelkanal eingeschoben werden können. Beim Bearbeiten von Dentin mit konventionellen Methoden entsteht auf der Präparationsoberfläche eine sog. Schmierschicht, die die Dentinkänälchen verschließt, sodass keine Dentinflüssigkeit ausströmen kann. Die Präparationsfläche ist daher vergleichsweise trocken. Eine Laserbearbeitung von Dentin führt demgegenüber zu Präparationsflächen mit offenliegenden Dentinkänälchen (Abb. 19.7) und eher feuchtem Präparationsgebiet, was im weiteren Behandlungsverlauf von Nachteil sein kann [16]. Weitere, rein praktische Probleme wie die Möglichkeit von Glasfaserbrüchen im

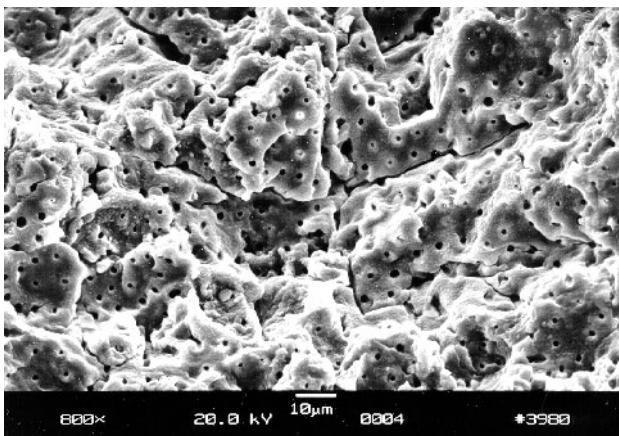


Abb. 19.7. Mit dem Er:YAG-Laser bearbeitete Dentinoberfläche. Die Dentinkänälchen sind geöffnet, sodass die Dentinflüssigkeit ausströmen kann

Wurzelkanal sind noch nicht zufriedenstellend gelöst, denn Faserfragmente sind meist nicht mehr zu entfernen [13]. Folglich ist der Einsatz eines Lasers in der Endodontologie ebenfalls zur Zeit nicht zu empfehlen.

19.5.5 Füllungen

Zahnärztliche Kompositkunststoffe bestehen aus einer Kunststoffmatrix (Dimethacrylate) und bis zu 80% aus Füllstoffpartikeln (z.B. SiO_2). Kompositkunststoffe werden in der Füllungstherapie verwendet. Sie werden adhäsiv eingesetzt, was ein entsprechendes Haftungsvermögen am Schmelz bzw. am Dentin voraussetzt. Zur Vergrößerung der Haftungsfläche wird der Zahnschmelz üblicherweise mit einem phosphorsäurehaltigen Gel angeätzt. Derartig retentive Ätzmuster können aber auch mit einigen Lasersystemen erzeugt werden, wie z.B. mit dem Kryptonfluoridexcimerlaser bei einer Wellenlänge von 288 nm. In diesem Fall scheint dieser Behandlungsschritt mit dem Laser sogar schneller und gezielter durchführbar zu sein [39]. Mit Farbstoffpenetrationstests konnte aber im Bereich der laserbehandelten Oberflächen erhöhte Penetrationen festgestellt werden, was auf Materialauflockerungen in diesem Bereich hindeutet [3]. Der Nutzen eines routinemäßigen Einsatzes des Lasers zur Oberflächenkontionierung ist daher zur Zeit noch fraglich.

Die mechanischen Eigenschaften von lichthärtenden Kunststoff-Füllungsmaterialien können durch die Anwendung in der Mundhöhle mit einem Argonlaser statt mit herkömmlicher Lichtquellen, deutlich verbessert werden [45]. Dieser Vorteil wird aber durch eine erheblich schlechtere Randdichtigkeit dieser Füllungswerkstoffe erkauft. Außerdem sind toxische Abbrandprodukte und unkontrollierte Reflexionen zu befürchten [45]. So schließt sich auch für diese Zwecke die Anwendung eines Lasers zur Zeit aus.

19.5.6 Kariesprophylaxe

Zur Kariesprophylaxe wurde vor einigen Jahren ein versiegelnder Effekt am Zahnschmelz durch Verschmelzung der Zahnoberfläche und Verschließen der Mikroporen mittels Laser postuliert. Derartige Behandlungen wären im Fissurenbereich (Furchen in den Kauflächen der Backenzähne) interessant, da dort mit dem Zahneputzen kein optimaler Reinigungseffekt zu erzielen ist und somit die Karies bevorzugt entstehen kann. Nach anfänglichen Erfolgen [26] ist von einer Anwendung derzeit abzuraten, da es zu thermisch bedingten Mikrorissen oder porösen Veränderungen kommen kann. Das Mittel der Wahl zur Schmelzversiegelung sind heute fließfähige Kunststoffe oder Zemente, die die z.T. grazilen Fissuren versiegeln und somit einen hervorragenden Schutz gegen die Karies bieten [40].

19.5.7 „Laserbiostimulation“ und Lokalanästhesie

Zur Unterstützung der Lokalanästhesie (örtliche Betäubung) werden die von Softlasern ausgehenden Effekte sehr kontrovers diskutiert. In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass bereits vor Einführung von Lasern in die Zahnheilkunde der niedrigdosierten Röntgenstrahlung derartig schmerzlindernde Effekte nachgesagt wurden, obwohl das wissenschaftliche Fundament für eine Erklärung des Phänomens niemals vorhanden war. Die Verhältnisse mit dem Laserlicht sind ähnlich. So wird z.B. von einem 2 mW HeNe-Laser berichtet, dass er in 95% der untersuchten Fälle den Behandlungsschmerz lindert [41]. Ebenso liegen Erfahrungsberichte vor, die eine diesbezügliche Wirksamkeit belegen möchten [23]. Der Nachweis, dass Softlaser reproduzierbare therapeutische Wirkungen im Sinne einer positiven Beeinflussung biologischer Prozesse beim Menschen haben, fehlt bislang. Mehrere Doppelblindstudien zur Beeinflussung der Wundheilung bzw. zur Schmerztherapie sind negativ ausgefallen [47].

Die Wirkungsweise kommerzieller Hardlasersysteme wird von vielen Anwendern demzufolge so verstanden, dass der Pilotlaser mit seinem kontinuierlichen Strahl für die Lokalanästhesie sorgt und die darauffolgenden Lichtpulse des Hardlasers dann im anästhesierten Bereich ihre ablative Wirkung entfalten. Da sich die subjektive Schmerzempfindung als Messgröße nicht objektivierbar gestalten lässt, wird diesbezüglich ein wissenschaftlicher Nachweis nur schwer zu führen sein. Die psychische Belastung des Patienten bei der Vorstellung, dass seine Zähne bei Laseranwendung berührungslos exkaviert werden, ist möglicherweise geringer als bei Gebrauch eines konventionellen Bohrers, der zudem unangenehme Laufgeräusche verbreitet. Auch das Verhalten des behandelnden Zahnarztes in fester Überzeugung von der Wirksamkeit der Laseranästhesie kann beim Patienten zu einer Verschiebung der Schmerzschwelle beitragen.

19.5.8 Laserschweißen

Fügearbeiten an zahnärztlichen Werkstücken werden konventionell mit Lötzungen oder mit Mikroplasmaverfahren ausgeführt. Als eine Alternative zu diesen Verfahren werden seit einigen Jahren Laser erprobt. Beim Laserschweißen werden zum lokalen Aufschmelzen bestimmter Prothesenwerkstoffe vorwiegend gepulste Nd:YAG-Laser eingesetzt [43]. Bei diesem Verfahren wird außerhalb der Mundhöhle gearbeitet. Im Gegensatz zum konventionellen Lötverfahren ist die Temperaturbelastung beim Laserschweißen erheblich niedriger. Die bei konventionellen Lötarbeiten erforderlichen Lotlegierungen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von den Legierungen der zu verbindenden Werkstücke. Dadurch sind in wenigen Fällen Korrosionserscheinungen aufgetreten, die als Ursache für Qualitätseinbußen des prosthetischen Zahnersatzes verantwortlich gemacht wurden. Beim Laserschweißen kann auf Fremdlegierungen demgegenüber verzichtet werden, sodass im Vergleich zum

Löten bessere Korrosionsfestigkeiten resultieren [19]. Da das Mikroplasmaschweißen nur an Nichtedelmetallen und nicht an goldhaltigen Legierungen möglich ist, kann es in den meisten Fällen ohnehin nicht in Betracht gezogen werden. Ein entscheidender Vorteil des Laserschweißverfahrens ergibt sich aus den Messungen zur Zerreißfestigkeit. Im Vergleich zur Lötung und zum Mikroplasmaschweißen können erheblich höhere Werte erzielt werden. Bei Prüfkörpern aus hoch goldhaltigen Legierungen konnten nach Laserschweißen sogar über 90% ihrer Zerreißfestigkeit gegenüber den aus einem Guss derselben Legierung hergestellten Prüfkörpern festgestellt werden [44]. Darüberhinaus ist die Reparatur herausnehmbarer metallischer Prothesenteile mit dem Laser möglich, ohne dass temperaturempfindliche keramische Aufblendmaterialien beschädigt werden [46]. Somit ist das Laserschweißen in der Zahntechnik einer der wenigen Anwendungsbereiche, die heute als gewinnbringend im Vergleich zum konventionellen Vorgehen angesehen werden können.

19.5.9 Diagnostik

Mit Hilfe des Dopplereffekts können Laser zur Bestimmung der Störmungsgeschwindigkeit von Blut in Gefäßen herangezogen werden. Hierzu werden insbesondere HeNe- oder Diodenlaser eingesetzt. Diese Methode liefert Aussagen über die Durchblutung des Zahnfleischs in Abhängigkeit verschiedener Einflussfaktoren wie Kaudruck, Kälte oder Wärme [2]. Weiterhin sind Durchblutungsmessungen bzw. Vitalitätsprüfungen in der Zahnpulpa möglich. Es konnte in Tierversuchen festgestellt werden, dass die Pulpa diesbezüglich auf Medikamentengaben und Temperaturänderungen empfindlich reagiert [37]. Reflexions- und Fluoreszenzspektroskopische Verfahren, bei denen Frequenzspektren analysiert werden, lassen Aussagen über kariöse Veränderungen in der Zahnhartsubstanz zu [1]. Mit der konfokalen Laserrastermikroskopie als einem bildgebenden Verfahren können demineralisierte Bereiche im Zahnschmelz visualisiert und vermessen werden [9]. Dieses Verfahren ist derzeit aus gerätetechnischen Gründen nur *in vitro* an extrahierte Zähnen einsetzbar. Aufgrund der hohen Investitionskosten für Diagnosegeräte, die mit Lasern arbeiten, haben sich diese Methoden in den Praxen niedergelassener Zahnärzte nicht durchsetzen können.

19.6 Ausblick

Der Einsatz von Lasern hat sich bei bestimmten chirurgischen Eingriffen an Weichgeweben und bei zahntechnischen Schweißarbeiten an zahnärztlichen Werkstoffen im Labor bewährt. In allen weiteren in diesem Kapitel aufgeführten Teilgebieten in der Zahnheilkunde ist eine deutliche Überlegenheit der Lasertherapie gegenüber konventionellen Behandlungsmethoden derzeit nicht nachvollziehbar. Insbesondere von einem möglichen Bohrerersatz, wie es von zahlreichen Seiten immer wieder behauptet wird, sind die zur Verfügung

stehenden Lasersysteme noch weit entfernt [33]. Zu diesem Ergebnis kam auch ein Expertenteam der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, das 1994 zusammen mit Vertretern der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung eine entsprechende Stellungnahme veröffentlicht hat [45].

Auch in naher Zukunft sind keine durchgreifenden Erfolge mit der Laseranwendung zu erwarten [32, 47]. Einzelne Anwendungsgebiete wie die Versiegelung von Wurzeloberflächen zur Desensibilisierung von Zahnhälsen sind zur Zeit denkbar. Ob sich allerdings eine derartige Anschaffung bei Kosten um etwa 50 000 bis 100 000 DM bzw. 25 000 bis 50 000 EUR für die Zahnarztpraxis lohnt, ist zweifelhaft. Der Indikationsbereich für Laser, der z.T. noch sehr umfangreich und optimistisch dargestellt wird [5, 6, 38], muss nach einer realistischen Kosten-Nutzen-Abschätzung stark eingeschränkt werden. Es bleibt abzuwarten, wie sich zukünftige Entwicklungen bewähren werden. Der Forschungsbedarf ist zur Zeit sehr hoch, und in vielen Universitätseinrichtungen wird auf diesem Gebiet gearbeitet. Kurzfristige, spektakuläre Ergebnisse sind aber nicht zu erwarten, da die Möglichkeit negativer Spätfolgen nur in längerfristig angelegten Versuchsreihen ausgeschlossen werden kann. Bis heute fehlen noch harte wissenschaftliche Fakten, die dem Laser in der Zahnheilkunde zum Durchbruch verhelfen könnten. Für derartige Beweise muss u.a. die Unbedenklichkeit für das vitale Pulpasystem aufgezeigt werden. So ist z.B. die Möglichkeit, dass die Dentinkanälchen als Lichtleiter wirken und das Laserlicht in die sensiblen Zellen des Pulpagewebes transportieren, in den meisten Untersuchungen nicht berücksichtigt worden. Weiterhin ist ein unbeabsichtigtes Bestrahlen von zahnärztlichen Metallen wie Goldlegierungen oder Amalgam nicht auszuschließen, wobei Reflexionen des Laserlichts auftreten können bzw. Metalldämpfe zu unerwünschten Nebenwirkungen führen können. Das absichtliche oder versehentliche Bestrahlen von Amalgamoberflächen im Mund des Patienten mit Festkörperlasern (Nd:YAG, Er:YAG, Nd:YLF) erzeugt Aufschmelzungen (Kraterbildungen, Abb. 19.8) und Verdampfungen. Das dabei freiwerdende Quecksilbergas [34] wird zu einem hohen Anteil über die Lunge resorbiert und führt zu einer unnötigen Belastung des menschlichen Organismus.

Dieses Restimme schließt aber nicht aus, dass in Zukunft mit dem Einsatz neuerer Systeme oder durch Optimierung der bekannten Systeme ein Einsatz des Lasers in weiteren Bereichen der Zahnheilkunde sinnvoll erscheinen kann.

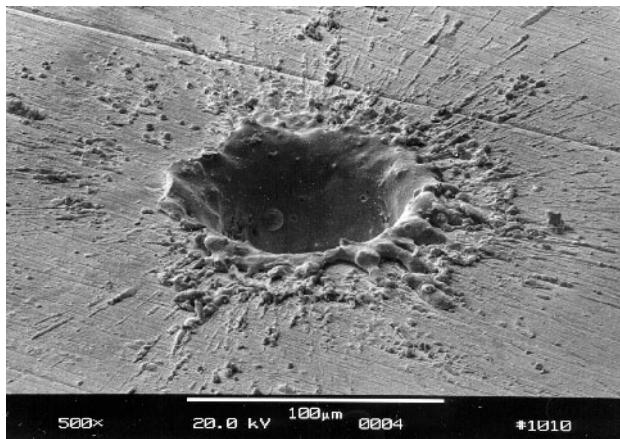


Abb. 19.8. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines Kraters, der durch Bestrahlung mit dem Er:YAG-Laser auf einer Amalgamoberfläche entstanden ist

Literatur

1. Alfano RR, Yao SS (1981) Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *J Dent Res* 60:120–122
2. Baab DA, Ake Öberg P, Holloway GA (1986) Gingival blood flow measured with a laser doppler flowmeter. *J Periodont Res* 21:73–85
3. Becker J, Schriever A, Heidemann D (1996) Randdichte von plastischen Füllungen nach computergesteuerter Erbium-YAG-Laserpräparation. *Dtsch Zahnärztl Z* 51:448–451
4. Boulnois J-L (1986) Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers Med Sci* 1:47–64
5. Bürger F (1996) Handbuch für die klinische Anwendung des Nd:YAG-Lasers EN060. Umschau-Zeitschriften, Breidenstein
6. Bürger F (1996) Handbuch für die klinische Anwendung des CO₂-Dentallasers SC20. Umschau-Zeitschriften, Breidenstein
7. Deppe H, Horch H-H, Wondrazek F, Zeilhofer H-F, Hauck RW, Roggan A (1997) Die zahnärztlich-chirurgische Behandlung gerinnungsgestörter Patienten mit dem gepulsten Nd:YAG-Laser. *Dtsch Zahnärztl Z* 52:39–41
8. Dunsche A, Fleiner B, Hoffmeister B (1994) Die Exzision von Mundschleimhautveränderungen mit dem CO₂-Laser. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:148–150
9. Duschner H (1995) Neue Anwendungen der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zur histomorphologischen Untersuchung von gesundem und kariösem Zahnhartgewebe mit dem Leica CLSM. *Mitt Wiss Tech* 11:20–24
10. Frame JW (1985) Carbon dioxide laser surgery for benign oral lesions. *Br Dent J* 158:125–128
11. Frentzen M, Koort HJ, Kramer B (1990) Thermische Effekte bei der Präparation von Zahnhartgewebe mit verschiedenen Lasersystemen. *Dtsch Zahnärztl Z* 45:240–242

12. Frentzen M, Koort HJ, Tack C (1990) Bearbeitung von Zahnhartgewebe mit einem UV-Laser unter spektroskopischer Kontrolle. *Dtsch Zahnärztl Z* 45:199–201
13. Frentzen M, Koort HJ (1991) Lasertechnik in der Zahnheilkunde. *Dtsch Zahnärztl Z* 46:443–454
14. Frentzen M (1994) Laseranwendungen in der Zahnerhaltung und Parodontologie: eine Übersicht. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:113–118
15. Gutknecht N, Behrens VG (1991) Die Bearbeitung der Wurzelkanalwände mit dem Nd:YAG Laser. *Zahnärztl Welt* 100:748–755
16. Gutknecht N, Ermert M, Lampert F (1994) Farbpenetrationsversuche am Dentin nach Behandlung mit einem Nd:YAG-Laser. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:157–159
17. Herzog M, Horch H-H (1994) Laser in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:106–112
18. Hibst R (1991) Lasereinsatz in der Zahnmedizin. *Medtech* 2:18–23
19. Kappert HF (1991) Werkstoffkunde-Atlas: Schweißtechnik mit Plasma und Laser. *Quintessenz Zahntech* 17:977–998
20. Keller U, Raab WHM, Hibst R (1991) Die Pulpreaktion während der Bestrahlung von Zahnhartsubstanzen mit dem Erbium-YAG-Laser. *Dtsch Zahnärztl Z* 46:158–160
21. Keller U (1993) Laser in der Zahnmedizin: Indikationen und klinische Perspektiven. *Zahnärztl Prax* 44:38–43
22. Keller U, Hibst R (1993) Kariestherapie mit dem Erbium-YAG-Laser. *Zahnärztl Welt* 102:804–807
23. Klein B (1991) Erfahrungsbericht mit dem Ora-Laser. *Zahnärztl Welt* 100:796–797
24. Kohns P, Zhou P, Schulz H, Willms L (1997) Ablation von Zahnhartsubstanz mit Femtosekunden-Laserimpulsen. *Zahnärztl Welt* 106:115–118
25. Krejci I, Simunovic K, Lutz F (1992) Substanzzabtragung mit super gepulstem CO₂-Laser. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 102:693–699
26. Lenz P, Gilde H, Pyttel U-J (1976) Reaktionen der Zahngewebe auf Laserbestrahlung. *Dtsch Zahnärztl Z* 31:884–886
27. Liesenhoff T, Bende T, Lenz H, Seiler T (1990) Grundlagen zur Anwendung des Excimer-Lasers in der Zahnheilkunde. *Dtsch Zahnärztl Z* 45:14–16
28. Masunaga H, Sugishita A, Endo H, Fujimaki M, Okamoto K, Tawara H, Matsue M, Matsue I (1992) Bactericidal effect of the Nd:YAG-Laser radiation in periodontal pockets. *Jap J Concerervative Dent* 35:96–100
29. Niemz MH (1994) Investigation and spectral analysis of the plasma-induced ablation mechanism of dental hydroxyapatite. *Appl Phys B* 58:273–281
30. Niemz MH (1995) Cacity preparation with the Nd:YLF picosecond laser. *J Dent Res* 74:1194–1199
31. Önal B, Ertl T, Siebert G, Müller G (1993) Vergleichende rasterelektronenmikroskopische Untersuchung über den mikromorphologischen Effekt von Nd:YAG, Excimer-Laser und Ultraschall bei der Wurzelkanalaufbereitung. *Zahnärztl Welt* 102:612–617
32. Pioch T (1993) Laser in der Zahnartpraxis. *Physik in unserer Zeit* 24:41–47
33. Pioch T (1994) Können Laser den Bohrer ersetzen? *Hess Zahnarzt* 33:16–17
34. Pioch T, Matthias J, Niemz M (1993) Hg-Dampf-Freisetzung von Amalgam bei Laserbeschuss. Abstract, Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung in der DGZMK

35. Pioch T, Niemz M, Mindermann A, Staehle HJ (1994) Schmelzablationen durch Laserimpulse im Pikosekundenbereich. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:163–165
36. Raab WHM, Müller H (1991) Temperaturabhängige Veränderungen der Mikrozirkulation der Zahnpulpa. *Dtsch Zahnärztl Z* 46:158–160
37. Raab WHM (1992) Temperature related changes in pulpal microcirculation. *Proc Finn Dent Soc* 88:469–479
38. Rinne AF (1992) Hart-Laser-Einsatz „Spitze des Dental-Fortschritts“. *Phillip J* 9:341–345
39. Ruppenthal T, Stratmann U, Schürenberg M, Czech D, Wessling G, Sergl HG (1991) Morphologische Ergebnisse zur Anwendbarkeit eines gepulsten Kryptonfluorid-Excimerlasers im Rahmen der Schmelzkonditionierung. *Fortschr Kieferorthop* 52:315–321
40. Staehle HJ (1994) Versiegelungen von Zähnen. *Quintessenz*, Berlin
41. Strang R, Moseley H, Carmichael A (1988) Soft Lasers: have they a place in dentistry? *Br Dent J* 165:221–225
42. The American Academy of Periodontology (1996) Laser in Periodontics (Position paper). *J Periodontol* 67:826–830
43. Vahl J, van Benthem H (1992) Laser in der Zahnmedizin, *Quintessenz*, Berlin Chicago
44. van Benthem H (1991) Vorteile des Laserschweissens im Vergleich zu konventionellen Fügeverfahren. *Quintessenz Zahntech* 17:1178–1193
45. van Benthem, H (1994) Laseranwendung in der Zahnmedizin. Gemeinsame Stellungnahme der DGZMK und der AfG 7/94. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:431–435
46. van Benthem H (1994) Laseranwendungen zur Materialbearbeitung. *Dtsch Zahnärztl Z* 49:119–123
47. Visser H (1994) Laser in der Zahnheilkunde. *Zahnärztebl BW* 5:222–224
48. Visser H, Mausberg R (1995) Erfahrungen mit dem CO₂-Laser in der Parodontologie. *Dtsch Zahnärztl Z* 50:334–336
49. Will G (1992) Laser im Praxiseinsatz. *Magazin für ZMK* 8:3–7
50. Willms L, Herschel A, Niemz MH, Pioch T (1996) Preparation of dental hard tissue with picosecond laser pulses. *Lasers Med Sci* 11:45–51

20 Lasersicherheit Gerätetechnik: Medizinproduktegesetz und Technische Normen

M. Götz

20.1 Einleitung

Die Fragen der Lasersicherheit im Hinblick auf die Gerätetechnik müssen weniger vom Laseranwender oder Betreiber als vor allem vom Laserhersteller beachtet werden. Deshalb greift dieses Kapitel im ersten Teil das für Hersteller von medizinischen Lasergeräten in Deutschland relevante Medizinproduktegesetz (MPG) auf, in dem auf allgemein anerkannte Regeln der Technik verwiesen wird.

Den allgemein anerkannten Stand der Technik in Europa zu erfassen, ist wiederum Ziel der im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften veröffentlichten harmonisierten Normen. Diese Normen werden in den Mitgliedstaaten in nationale Normen umgesetzt. Die Fundstellen der deutschen Normen werden im Bundesanzeiger bekanntgemacht. Im zweiten Teil des Kapitels sollen einige technische Normen exemplarisch vorgestellt werden.

20.2 Medizinproduktegesetz

Mit dem Ziel, Handelshemmnisse in Europa abzubauen und gleichzeitig hohe Produktsicherheit für Patienten, Anwender und Dritte zu gewährleisten, hat die EG drei Richtlinien formuliert:

- 90/385/EWG des Rates vom 20.6.1990 über aktive implantierbare medizinische Geräte;
- 93/42/EWG des Rates vom 14.6.1993 über Medizinprodukte;
- über In-vitro-Diagnostika (noch nicht erschienen).

Diese europäischen Richtlinien wurden mit dem *Gesetz über Medizinprodukte* (Medizinproduktegesetz, MPG) vom 2.8.1994 in nationales Recht umgesetzt. Das Gesetz trat am 1.1.1995 mit einer Übergangsfrist bis zum 13.6.1998 in Kraft¹. Weil das MPG über europäisches Recht hinaus die bisher in Deutsch-

¹ Das EMV-Gesetz (Elektromagnetische Verträglichkeit) ist seit dem 1.1.1996 in Kraft. Für Quecksilberglästhermometer wurde die Übergangsfrist bis zum 30.6.2004 verlängert.

land anzuwendende *Medizingeräteverordnung* (MedGV) mit einbezieht, befasst sich das Gesetz mit dem Errichten und Betreiben von Medizinprodukten. Anders als die MedGV vereint das MPG technische und medizinische Anforderungen in einem Gesetz.

Wichtige Prinzipien des MPG sind der Nachweis der vom Hersteller angegebenen Zweckbestimmung, die Risikoanalyse und klinische Bewertung und das Risiko- und Fehlermanagement. Technische Spezifikationen ergeben sich aus harmonisierten Europäischen Normen. Arbeitsschutz- und Unfallverhütungsvorschriften müssen beachtet werden.

Das MPG fordert für alle Medizinprodukte eine CE-Kennzeichnung als äußeres Merkmal für die Konformität mit den Bestimmungen der EG-Richtlinie. Ab dem 13.6.1998 dürfen in Europa nur noch CE-gekennzeichnete Produkte in Verkehr gebracht werden².

20.2.1 Zertifizierung – Akkreditierung – Prüfung (Benannte Stellen)

Gemäß der Philosophie der Europäischen Union, deren Sicherheitskonzept auf der Verantwortung des Herstellers beruht, gibt es keine staatliche Zulassung der Produkte. Die Prüfung der Übereinstimmung eines Produktes mit in den Richtlinien enthaltenen grundlegenden Anforderungen erfolgt vielmehr im Rahmen von Konformitätsbewertungsverfahren durch neutrale Dritte. In Deutschland werden diese Zertifizierungsstellen oder „benannte Stellen“ ihrerseits von der Zentralstelle der Länder für Sicherheitstechnik (ZLS) und der Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Medizinprodukten (ZLG) kontrolliert.

Alle in Europa akkreditierten benannten Stellen werden im Amtsblatt der EG veröffentlicht. Beispiele in Deutschland sind der TÜV Product Service in München, die DEKRA Certification Services in Stuttgart oder die Landesgewerbeanstalt LGA Bayern in Nürnberg. Der Hersteller darf sich eine benannte Stelle frei wählen.

20.2.2 Grundlegende Anforderungen

Das Bundesministerium für Gesundheit wird in §5 MPG zur Bestimmung der grundlegenden Anforderungen ermächtigt. Da das Bundesministerium in seiner Verordnung über Medizinprodukte ähnlich wie bei anderen Aspekten direkt auf die Richtlinie 93/42/EWG verweist, ergeben sich die grundlegenden Anforderungen faktisch aus Anhang I der genannten Richtlinie. Die Bezeichnung „grundlegend“ legt bereits nahe, dass die Formulierung der Anforderungen eher unspezifisch bleibt:

I. Allgemeine Anforderungen

² Ausnahmen bilden Sonderanfertigungen und für klinische Prüfungen bestimmte Medizinprodukte.

1. vertretbar minimierte Gefährdung von Patienten, Anwendern und Dritten
 2. Auslegung nach den Grundsätzen der integrierten Sicherheit (Beseitigung oder Minimierung von Risiken; angemessene Schutzmaßnahmen und Alarmvorrichtungen; Information über Restrisiken)
 3. Erfüllung der Leistungsangaben des Herstellers
 4. keine Änderungen bei normalen Einsatzbedingungen
 5. keine Änderungen bei Lagerung/Transport
 6. keine unvertretbaren Risiken
- II. Anforderungen an Auslegung und Konstruktion
7. Chemische, physikalische und biologische Verträglichkeit der Produkte und verwendeten Werkstoffe
 8. Infektion und mikrobakterielle Kontamination: geeignete Verpackung, validierte Sterilisationsverfahren, minimierte Infektionsrisiken
 9. Konstruktion und Umgebungsbedingungen: sichere Anschlüsse, EMV, Brand- und Explosionsschutz
 10. Produkte mit Messfunktion: angemessene Genauigkeit und Konstanz, ergonomische Auslegung
 11. keine gefährdende Strahlenemission, optische oder akustische Anzeige der Strahlenemission, umfassend Dokumentation
 12. Anforderungen an Produkte mit externer oder interner Energiequelle: keine Risiken durch Softwarefehler, Ladezustandsanzeige bei Akkus, Alarmsystem bei Energieausfall, elektromagnetische Abschirmung
 13. Kennzeichnung der Produkte und Inhalte der Gebrauchsanweisung.

Erstmals muss nach dem MPG der Nachweis erbracht werden, dass das Produkt die vom Hersteller angegebene Zweckbestimmung erfüllt. Es stehen nicht mehr ausschliesslich Sicherheitsfragen und Dokumentationspflichten im Mittelpunkt.

20.2.3 Risikoklassen

Medizinprodukte werden gemäß Anhang IX der Richtlinie 93/42/EWG in vier Risikoklassen I, IIa, IIb und III eingeteilt. Der Hersteller ist für die richtige Klassifizierung seines Produkts verantwortlich. Die Klassifizierung orientiert sich dabei an 18 Regeln mit folgenden Hauptkriterien:

- Dauer der Anwendung,
- Kontakt oder Wechselwirkung mit dem Körper,
- Kontakt mit verletzter Haut,
- invasiv oder nichtinvasiv,
- Implantation in den Körper,
- Kontakt mit lebenswichtigen Organen (ZNS, Herz, Kreislauf),
- Abgabe von Energie oder Substanzen in oder an den Körper.

Die Anwendung der Regeln richtet sich nach der Zweckbestimmung der Produkte. Produktkombinationen und Zubehör werden unabhängig voneinander jeweils einzeln klassifiziert. Software, die ein Produkt steuert oder dessen Anwendung beeinflusst, wird derselben Klasse zugeordnet wie das Produkt.

Wenn auch nur eine Komponente einer Gerätekombination keine CE-Kennzeichnung trägt, muss ein komplettes Konformitätsbewertungsverfahren entsprechend der Zweckbestimmung der Gerätekombination durchgeführt werden.

20.2.4 Konformitätsbewertungsverfahren

In der EG-Konformitätserklärung wird die Übereinstimmung der Medizinprodukte mit den einschlägigen Bestimmungen der Richtlinie 93/42/EWG sichergestellt und erklärt. Das anzuwendende Konformitätsbewertungsverfahren orientiert sich an den obigen Risikoklassen. Die Alternativen für Produkte der verschiedenen Klassen sind in Abb. 20.1 skizziert und werden in Anhängen zur Richtlinie spezifiziert.

Bei Medizinprodukten der Klassen IIa, IIb und III sind demnach verschiedene Formen von Qualitätssicherungssystemen (QS-Systemen) erforderlich. Wesentliches Element eines jeden QS-Systems ist die Zusicherung, „ein systematisches Verfahren einzurichten und auf dem neuesten Stand zu halten, mit dem Erfahrungen mit Produkten in den der Herstellung nachgelagerten Phasen ausgewertet werden, und Vorkehrungen zu treffen, um erforderliche Korrekturen durchzuführen. Diese Zusicherung schließt die Verpflichtung des Herstellers ein, die zuständigen Behörden unverzüglich über folgende Vorkommnisse zu unterrichten, sobald er selbst davon Kenntnis erlangt hat:

	EG-Konformitäts- erklärung Vollständiges QS-System (II)	EG-Baumuster- prüfung (III)	EG-Prüfung gemäß IV	EG-Konformitäts- erklärung QS Produktion (V)	EG-Konformitäts- erklärung QS Produktion (VI)	EG-Konformitäts- erklärung (VII) Herstellerdeklaration
Klasse III	■ mit Auslegungs- prüfung	■	■	■		
oder						
Klasse IIb	■ ohne Auslegungs- prüfung	■	■			
oder						
oder				■		
oder					■	
Klasse IIa		■		■		■
oder					■	■
oder						■
Klasse I						■

Abb. 20.1. Alternative Konformitätsbewertungsverfahren für die verschiedenen Risikoklassen

- (i) jede Funktionsstörung oder jede Änderung der Merkmale und/oder der Leistung sowie jede Unsachgemäßheit der Kennzeichnung oder der Gebrauchsanweisung eines Produkts, die zum Tode oder einer schwerwiegenden Verschlechterung des Gesundheitszustands eines Patienten oder eines Anwenders führen kann oder geführt hat;
- (ii) jeder Grund technischer oder medizinischer Art, der aufgrund der unter Ziffer (i) genannten Ursachen durch die Merkmale und Leistungen des Produkts bedingt ist und zum systematischen Rückruf von Produkten desselben Typs durch den Hersteller geführt hat.“

Bei den EG-Konformitätserklärungen nach den Anhängen II (Vollständiges QS-System), V (QS-Produktion) und VI (QS-Produkt) reicht der Hersteller einen Antrag auf die Bewertung des Qualitätssicherungssystems bei einer benannten Stelle ein, der diese Zusicherung enthält. Entsprechend muss dann auch eine förmliche Überprüfung („Audit“) durch die benannte Stelle erfolgen. Bei der EG-Prüfung nach Anhang IV hingegen sichert der Hersteller selbst zu, ohne von einer benannten Stelle zertifiziert zu werden.

Das QS-System fußt auf einer geordneten Dokumentation (Qualitätsziele und Organisation des Unternehmens, ausführliche Beschreibungen, Konstruktionsunterlagen, Angabe der anzuwendenden Normen, Ergebnisse der Risikoanalyse, Kontrolltechniken, klinische Daten, etc.). Während sich die Elemente des vollständigen QS-Systems auf alle Stufen von der Auslegung bis zur Endkontrolle beziehen, wirkt die QS Produktion nur auf der Ebene der Herstellung (auch Verfahren zur Produktidentifizierung!, Sterilisation) und Endkontrolle, die QS-Produkt sogar nur auf der Ebene der Endkontrolle des Produkts.

Bei der *EG-Baumusterprüfung* stellt die benannte Stelle die Übereinstimmung mit den einschlägigen Bestimmungen der Richtlinie 93/42/EWG an einem repräsentativen Exemplar des Produkts fest und bescheinigt diese. Im Wesentlichen wird die Dokumentation und die Übereinstimmung des Bauamusters mit der Dokumentation bewertet. Die benannte Stelle führt Prüfungen und Tests durch oder lässt diese durchführen.

Bei der *EG-Prüfung* nach Anhang IV gewährleistet und erklärt der Hersteller, dass die Produkte mit dem in der EG-Baumusterprüfung beschriebenen Exemplar übereinstimmen. Dabei kann entweder jedes einzelne Produkt geprüft werden oder eine statistische Überprüfung erfolgen.

20.2.5 Betreiberverordnung über aktive Medizinprodukte

Aus einer im MPG motivierten Verordnung gehen einige Vorschriften an Betreiber von aktiven Medizinprodukten hervor³. Es wird insbesondere gefordert, dass

³ Aktive Medizinprodukte sind solche, die durch eine Stromquelle oder eine andere Energiequelle betrieben werden.

- der Anwender ausreichend ausgebildet und in die Funktion des Produkts eingewiesen sein muss,
- der Anwender sich von der Funktionsfähigkeit und dem ordnungsgemäßen Zustand des Medizinprodukts überzeugen muss,
- regelmäßige Sicherheitskontrollen durch den Hersteller stattfinden und
- (beispielsweise für Lasergeräte) ein Medizinproduktebuch geführt werden muss.

20.2.6 Für die klinische Prüfung bestimmte Produkte

Für Produkte, die für eine klinische Prüfung vorgesehen sind, gibt es spezielle Regelungen. Allgemein wird die sicherheitstechnische Unbedenklichkeit unter Berücksichtigung des Stands der Technik sowie der Arbeitsschutz- und Unfallverhütungsvorschriften vorausgesetzt. Die klinische Prüfung muss durch einen namentlich benannten Arzt oder eine entsprechend qualifizierte Person erfolgen.

Um das Produkt auch ohne CE-Kennzeichnung einsetzen zu dürfen, ist nach Anhang VIII der Richtlinie 93/42/EWG vor allem ein Prüfplan mit Angaben zu dem Ziel, zu den wissenschaftlichen, technischen und medizinischen Gründen und zum Umfang der Prüfungen erforderlich. Außerdem wird eine Genehmigung durch die Ethikkommission verlangt. Der Patient muss seine Einwilligung erklären. Die klinischen Prüfungen müssen unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt werden, wie sie für die normalen Einsatzbedingungen des Produktes gelten.

20.3 Technische Normen für medizinische Laser

Die grundlegenden Anforderungen werden in technischen Normen konkretisiert (Abb. 20.2). Die Anwendung der Normen bleibt dabei freiwillig; der Hersteller kann auch von den Normen abweichen. Dann liegt die Beweislast

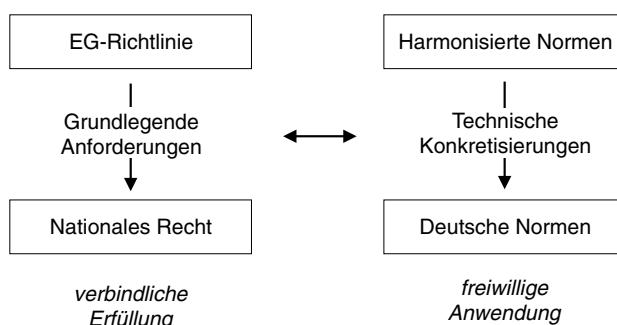


Abb. 20.2. Veranschaulichung der „Neuen Konzeption“ der EG und Umsetzung in nationales Recht

für die Einhaltung der grundlegenden Sicherheitsanforderungen bei ihm. Die benannten Stellen stellen die Konformität mit den EG-Richtlinien fest.

Nationale, europäische und internationale Normen können in ihrer jeweils aktuellen Fassung vom Beuth Verlag bezogen werden, der organschaftlich mit dem Deutschen Institut für Normung e.V. verbunden ist. Bei Recherche nach den Stichworten Laser/Laseranlagen/Lasergeräte findet man auf dessen Homepage (<http://www.beuth.de>) insgesamt 41 Normen. Die für den medizinischen Bereich interessantesten sind mit Status und Ausgabedatum in Tabelle 20.1 zusammengestellt.

Tabelle 20.1. Zusammenstellung einiger technischer Normen, die explizite Regeln für Laser enthalten (Stand: 30.1.1998)

Norm	Status	Titel	Ausgabe
DIN EN 31252	Norm	Laser und Laseranlagen – Lasergeräte – Mindestanforderungen an die Dokumentation (ISO 11252:1993)	1994–11
DIN EN 60601-2-22	Norm	Medizinische elektrische Geräte – Teil 2: Besondere Festlegungen für die Sicherheit von diagnostischen und therapeutischen Lasergeräten (IEC 60601-2-22 1995)	1996–12
DIN EN 60825-1	Norm	Sicherheit von Lasereinrichtungen – Teil 1: Klassifizierung von Anlagen, Anforderungen und Benutzerrichtlinien (IEC 60825-1:1993)	1997–03
DIN IEC 76/136/CD	Entwurf	Entwurf IEC 60825-5 – Teil 5: Checkliste für Hersteller für IEC 60825-1 (IEC 76/136/CD:1996)	1996–07
DIN EN ISO 11145	Norm	Optik und optische Instrumente – Laser und Laseranlagen – Begriffe und Formelzeichen (ISO 11145:1994)	1995–02
ISO 11145	ISO-Norm	Optics and optical instruments – Lasers and laser-related equipment – Vocabulary and symbols	1994–11
DIN V 18734	Vornorm	Laser und Laseranlagen; Medizinisch-therapeutische Lasergeräte; Qualitäts- und sicherheitstechnische Anforderungen	1991–01
DIN EN ISO 11990	Entwurf	Optik und optische Instrumente – Laser und Laseranlagen – Bestimmung der Laserresistenz des Schafes von Trachealtuben (ISO/DIS 11990:1997)	1997–12
DIN V 18735	Vornorm	Laser und Laseranlagen; Zubehör für medizinische Lasergeräte; lasergeeignete Oberflächen für chirurgische Instrumente	1991–04

Am Beispiel der DIN EN ISO 11145 wurde auch die internationale Norm mit angegeben. Einige internationale Normen gibt es nur in englischer Sprache.

In vielen Normen wird auf weitere Normen verwiesen, die allgemeineren Charakter haben und für alle elektrotechnischen Geräte und Verfahren von Bedeutung sind. Einige davon sind in Tabelle 20.2 aufgeführt.

Tabelle 20.2. Technische Normen allgemeinen Charakters (Stand: 30.1.1998)

Norm	Status	Titel	Ausgabe
DIN 60601-1	Norm	Sicherheitsanforderungen an medizinische elektrische Systeme	1992-12
DIN EN 207	Norm	Persönlicher Augenschutz; Filter und Augenschutz gegen Laserstrahlung (Laserschutzbrillen)	1993-12

20.3.1 Bezeichnungen

Die Bezeichnungen der Normen mit Namenskürzeln und Nummern sollten aus den folgenden Erläuterungen unter Berücksichtigung von Tabelle 20.3 klar werden. DIN-Normen sind vom Deutschen Institut für Normung e.V. herausgegebene Normen. Viele der Normen basieren auf von der ISO und der IEC herausgegebenen internationalen Normen und sind entsprechend gekennzeichnet. Die europäischen Normen, die von der CEN/CENELEC herausgegeben werden, orientieren sich an den ISO-Normen. Es werden jedoch auch spezifische europäische Normen erarbeitet, wenn die internationalen Normungsorganisationen noch keine geeigneten Ergebnisse vorlegen können.

Viele DIN-Normen tragen außer den obigen Bezeichnungen noch eine VDE-Nummer, wenn sie gleichzeitig zu den vom Verband Deutscher Elektrotechniker e.V. genehmigten VDE-Bestimmungen gehören. Eine Vornorm

Tabelle 20.3. Erklärung der in den Normenbezeichnungen genannten und einiger weiterer Abkürzungen

Akronym	Bezeichnung
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
EN	Europäische Norm
IEC	Internationale Elektrotechnische Kommission
ISO	Internationale Organisation für Normung
V	Vornorm
CEN	Europäisches Komitee für Normung
CENELEC	Europäisches Komitee für Elektrotechnische Normung

war bis etwa März 1985 eine Norm, zu der noch Vorbehalte hinsichtlich der Anwendung bestanden und nach der versuchsweise gearbeitet werden konnte. Seit April 1985 wird eine Vornorm nicht mehr als Norm herausgegeben, sodass auch Arbeitsergebnisse, zu deren Inhalt noch Vorbehalte bestehen oder deren Aufstellungsverfahren gegenüber dem einer Norm abweicht, als Vornorm herausgegeben werden können.

Ein Normentwurf ist das vorläufig abgeschlossene Ergebnis einer Normungsarbeit, das in der Fassung der vorgesehenen Norm der Öffentlichkeit zur Stellungnahme vorgelegt wird.

20.3.2 Die zehn Grundgedanken der Normung

Das DIN orientiert seine Arbeit an zehn Grundgedanken:

1. Freiwilligkeit,
2. Öffentlichkeit: alle Normungsvorhaben und Entwürfe zu DIN-Normen werden öffentlich bekanntgemacht. Das DIN informiert über alle technischen Regeln in Deutschland, einschließlich der vom Staat herausgegebenen Gesetze und Verordnungen mit technischem Inhalt;
3. Beteiligung aller interessierten Kreise,
4. Einheitlichkeit und Widerspruchsfreiheit,
5. Sachbezogenheit: Die DIN-Normen sind als Niederschrift des technischen Erfahrungsstands zu verstehen;
6. Konsens,
7. Ausrichtung am Stand der Technik: Die DIN bewegt sich in dem Rahmen, den die naturwissenschaftliche Erkenntnis vorgibt. Es sorgt für die schnelle Umsetzung neuer Erkenntnisse in DIN-Normen;
8. Ausrichtung an den wirtschaftlichen Gegebenheiten: Jede Normensetzung wird auf ihre wirtschaftlichen Wirkungen hin untersucht. Es wird nur das unbedingt Notwendige genormt. Normung ist kein Selbstzweck;
9. Ausrichtung am allgemeinen Nutzen: Ausgehend von der naturwissenschaftlichen Erkenntnis haben DIN-Normen gesamtgesellschaftliche Ziele einzubeziehen. Es gibt keine wertfreie Normung. Der Nutzen für alle steht über dem Vorteil einzelner;
10. Internationalität: Ziele der DIN sind ein von technischen Hemmnissen freier Welthandel. Insbesondere die Europäische Union bedarf einheitlicher Normen.

20.3.3 Die Norm DIN EN 60825-1

Die Norm über die Sicherheit von Lasereinrichtungen beschäftigt sich im Teil 1 mit der Klassifizierung von Anlagen, Anforderungen für die Herstellung von Anlagen und Benutzerrichtlinien. Es handelt sich um die Übersetzung der internationalen Norm IEC 825-1.

In dieser Norm werden Werte für die maximal zulässige Bestrahlung (MZB in J/m^2) angegeben. Die MZB-Werte stellen die maximalen Werte dar, denen das Auge oder die Haut ausgesetzt werden können, ohne dass damit Verletzungen unmittelbar oder nach einer langen Zeit verbunden sind. Die Norm legt auch die Grenzwerte der zugänglichen Strahlung für die verschiedenen Laserklassen 1, 2, 3A, 3B und 4 fest. Diese Klassifizierung ist nicht Gegenstand dieses Kapitels und wird im Folgenden als bekannt vorausgesetzt.

Neben der Verpflichtung der Hersteller zur richtigen Klassifizierung von Lasereinrichtungen werden auch konkrete Konstruktionsanforderungen benannt: So ist für jede Lasereinrichtung ein Schutzgehäuse vorgeschrieben, für dessen Öffnung, beispielsweise zu Servicezwecken, ein Werkzeug erforderlich sein muss. An Abdeckplatten von Schutzgehäusen muss eine Sicherheitsverriegelung angebracht sein, wenn durch Entfernen der Abdeckplatte Strahlung der Klassen 3B oder 4 zugänglich wird. Durch die Öffnung darf keine Strahlung austreten, die die Grenzwerte der zulässigen Strahlung der Klasse 3A übersteigt.

Für Laser der Klassen 4 und 3B, ausser der Klasse 3B, mit nicht mehr als 5-mal dem Strahlungsgrenzwert der Klasse 2 im Wellenlängenbereich von 400–700 nm, gibt es weitere Regelungen: Diese Laser müssen einen Steckverbinder für eine fernbedienbare Sicherheitsverriegelung, einen abziehbaren Schlüssel als Hauptschalter und eine ausfallsichere und redundante, optische oder akustische Emissionswarneinrichtung besitzen. Bedieneinrichtungen mit mehr als 2 m Abstand benötigen eine Strahlungs-Warneinrichtung. Weiterhin muss ein Strahlfänger oder Abschwächer dauerhaft befestigt sein, der in der Lage ist, für Personen den Zugang zu Laserstrahlung über den Strahlungsgrenzwerten für die Klassen 1, 2 und 3A zu verhindern.

Alle in einer Lasereinrichtung eingebauten Beobachtungsoptiken, Öffnungen oder Anzeigeschirme müssen eine Strahldämpfung enthalten, die ausreicht, zugängliche Strahlung über den Grenzwerten für die Klasse 1 zu verhindern.

Weitere ausführliche Abschnitte der Norm befassen sich mit der Beschilderung von Lasern und den Informationen, die der Hersteller dem Benutzer übergeben muss.

Normen dürfen nur im Original gelesen werden. Deshalb sollten die hier herausgestellten Inhalte dieser Norm lediglich als subjektive Bewertung der tatsächlichen Bedeutung verstanden werden.

20.3.4 Die Vornorm DIN V 18734 (Medizinisch-Therapeutische Lasergeräte)

Diese Norm verweist in großen Teilen auf die Norm DIN IEC 601-1 (VDE 0750 Teil 1: Sicherheit elektromedizinischer Geräte; allgemeine Festlegungen), enthält aber darüber hinaus auch weitere Festlegungen im Sinne der VBG 93. Sie gilt für gerätespezifische Anwendungen von medizinischen Lasern einschließlich des dafür notwendigen Zubehörs wie Strahlführungs- und Ap-

plikationssysteme. Neben Qualitäts- und Sicherheitsanforderungen enthält sie auch umfangreiche Festlegungen zu Umweltbedingungen für Transport, Lagerung und Aufstellung, sowie für Anwendung und Instandhaltung.

Einige interessante Festlegungen sind die folgenden:

- Für Strahlführungssysteme (Glasfasern, Gelenkspiegelarme) wird eine hinreichende Bestrahlungsfestigkeit gefordert. Diese „ist gegeben, wenn im Fehlerfall, u.a. erkennbar durch Ausfall des Zielstrahls am Auftreffpunkt, in der Zeit von 2 s, die der Anwender bei sachgemäßem Vorgehen vom Erkennen des Fehlers bis zum Abschalten des Behandlungsstrahls benötigt, keine Schädigung am Patienten auftritt.“
- Grenzabweichungen für die Applikationsparameter:
 - Laserleistung: $\pm 20\%$,
 - gemittelte Pulsennergie: $\pm 20\%$,
 - Pulsennergie für den Einzelpuls: $\pm 50\%$,
 - Applikationsdauer: $\pm 20\%$,
 - die einer Pulsennergie zugeordnete Pulsdauer: $\pm 50\%$,
 - Bestrahldurchmesser: $> 2 \text{ mm}$: $\pm 20\%$ und $< 2 \text{ mm}$: $\pm 50\%$.
- Ein eingesetzter Zielstrahl muss mit dem Applikationsstrahl koaxial sein und im Auftretpunkt je nach Bestrahldurchmesser um maximal 20% ($> 1 \text{ mm}$) bzw. 50% ($< 1 \text{ mm}$) lateral abweichen.

In der Norm werden außerdem verschiedene Schalter (Freigabeschalter, Auslöseschalter, Schlüsselschalter, Notausschalter) benannt, die eine versehentliche Laserapplikation verhindern sollen.

Auch hier sei erwähnt, dass die herausgestellten Punkte einer subjektiven Auswahl entsprechen.

Literatur

1. Kindler M, Menke W (1995) Medizinproduktegesetz - MPG, Kommentierte Ausgabe mit Arbeitshilfen und Materialien. ecomed, Landsberg/Lech
2. DIN-VDE-Taschenbuch, DKE-Auswahlreihe (1995) Laser, Sicherheitstechnische Festlegungen für Lasergeräte und -anlagen. VDE-Verlag, Beuth
3. <http://www.beuth.de>

Sachverzeichnis

- 4 π -konfokale Mikroskopie 204
- Aberration 9, 28, 42
 - chromatische 10
 - höherer Ordnung 22
 - sphärische 9
- Aberrometer 22, 28
 - Tscherning- 22
- Absorption 39, 40, 49, 116
 - Koeffizient 39
 - integraler 118
 - Querschnitt 112
 - integraler 118
 - Rate 191
 - Spektroskopie 116, 118
 - dopplerfreie 123
 - nichtlineare 132
- Acuity Map 26
- adaptive Optik 407
- Aderhaut 2
- Airy-Scheibe 7, 184
- Akkommodation 2
- Amplitude Spread Function 12
- Amplitudenverwaschungsfunktion 12
- Anti-Stokes 128
- Ar⁺-Laser 281
- Argon-Laser 281
- ASF 12
- Astigmatismus 10
- Auflösung 180
 - axiale 139
 - laterale 139
- Auflösungsvermögen 66
- Augapfel 1
- Auge
 - Auflösungsvermögen 5
 - Beugungseffekte 6
 - Brechkraft 2
- Kammer
- hintere 1
- vordere 1
- Modelle 3
- optische Qualität 12
- Physiologie 1
- reduziertes 3
- schematisches 3
- Augentomograph 347
- Autofluoreszenz 404, 405
- Babinet-Prinzip 59
- Bandpassfilter 224
- Baumusterprüfung 439
- Beer-Gesetz 83, 117
- Beleuchtungspunktabbildungsfunktion 183
- benannte Stellen 436
- Beschichtungen 44
 - Antireflex- 45
 - dielektrische 45
 - metallische 44
- Bestrahlungstechniken, stereotaktische 394
- Betreiberverordnung 439
- Beugung 53
 - am Doppelspalt 54
 - am Einzelspalt 55
 - am Gitter 56
 - an kreisförmiger Blende 62
 - an rechteckiger Blende 61
 - Beispiele 53
 - Fraunhofer- 60
 - Integral 58
 - Theorie 57
- blinder Fleck 5
- Blitzlampen 293
- Bowman-Membran 358

- Brechkraft 41
- Brechungsindex 39, 89
- C-PSF 186
- CARS 128
 - -Spektroskopie, Anwendungen 132
- Cavalieri-Estimator 146
- Cavity-Ringdown-Spektroskopie 122
- CCD 49
- CD-Auslesesystem 237
- CE-Kennzeichnung 436
- Charge-Coupled Devices 49
- chromatische Aberration 10
- Chromosomenterritorien
 - Exklusivität 159
 - Morphologie 159
 - Topologie 162
- Closed Loop 409
- CLSM 141
- CO₂-Laser 282–284
- Coating 40, 44–46
- Cornea 357
- Cornu-Spirale 69
- Cr:Nd:GSGG-Laser 298
- Dämpfung 93
- Daten-
 - -erfassung 237
 - -speicherung 237
 - -verarbeitung 237
 - -wiedergabe 237
- Defokus 10
- Dentin 414
- Descemet-Membran 358
- diabetische Retinopathie 353
- dielektrische Beschichtungen 45
- digitale Holographie 254
- digitale Interferometrie 266
- DIN EN 60825-1 443
- DIN V 18734 444
- DIN-Normen 442
- diodengepumpte Festkörperlaser 303
- Diodenlaser 301
- Dipolmoment 94, 127
- Dispersion 90, 116
 - Relation 91
- Distanzmessung
 - interferometrische 272
- Doppelbelichtungsholographie 252
- Doppelbrechung, induzierte 97
- Doppelspalt 54
- dreidimensionale Mikroskopie 139, 144
 - des Genoms 144
 - Grundprinzip 139
- Dreiphotonenmikroskopie 195
- Durchflusszytometrie 215
- Echtzeitholographie 252, 253
- Effective Blur 27
- Effekt, linearer elektrooptischer 96
- effektive Lebensdauer 115
- EG-Konformitätserklärung 438
- EG-Richtlinien 435
- Einstein-A-Koeffizient 113
- Einzelpunkt 55
- Elastizitätsmodul 41
- Elektronenmikroskopie 181
- elektrooptische Modulatoren 48
- Emissionsspektrum 283, 284
- Emmetropie 10
- Endodontologie 425
- Endothel 358
- Epithel 358
- Erbiumlaser 300
- Excimerlaser 30, 286
- Faraday-Rotator 48
- Farbstofflaser 290
- Fernfeldmikroskope 181
- Festkörperlaser 295
 - diodengepumpte 303
 - vibronische 300
- Fizeau
 - Interferenz 260
 - Interferometer 261
- Flow-Zytometrie 215
- Fluoreszenz
 - laserinduzierte 111
 - Markierung 230
 - Messung 224
 - Mikroskopie 179, 403
 - konfokale 140, 243
 - Quantenausbeute 120
 - Rastermikroskop 182
 - konfokales 182
 - Fluorochrom 230
 - Flussphotometrie 215

- Flusszytometer
 - Aufbau 217
 - Prinzip 217
 - technische Aspekte 220
- Flusszytometrie 215
- Fourier-Ellipsometer 351
- Fovea 2
- Fraunhofer-Beugung 60
- Freie-Elektronen-Laser 319
- Fresnel-Beugung 66
- Füllungen 427
- Funktion
 - Amplitude Spread Function 12
 - Modulation Transfer Function 13
 - Optical Transfer Function 13
 - Phasentransfer- 13
 - Point Spread Function 12
- FWM-Spektroskopie 135
- Gain-Guiding 318
- Galvanometerscanner 245
- Gaslaser 279
- Gauß-Strahl 79
- Gitter 56
- Glaskörper 2
- Glaukom 348, 355
- grauer Star 354
- Ground-State-Depletion Microscopy 213
- grüner Star 348, 355
- grundlegende Anforderungen 436
- Grundzustandsentvölkerungs-
 - mikroskopie 213
- GSD 213
- Güteschaltung 101
 - aktive 101
 - passive 102
- Halbleiterlaser 300
- Hardlaser 413
- Hartmann-Shack-
 - Sensor 24, 408
 - Wellenfrontsensor 19, 24
- Helmholtz-Gleichung 79
- HeNe-Laser 279
- Heterodyn-
 - -interferometrie 271
 - -verfahren 266, 271
- HMD 369
- Holmiumlaser 300
- Hologramm 254
 - Aufzeichnung 249
 - Rekonstruktion 250
- Holographie 249
 - digitale 254
- holographische Interferometrie 251
- Speichermaterial 253
- Verfahren 252
- Vorteile 252
- Hornhaut 1, 15, 357
 - Topographie 15
- HSS 24, 408
- Huygens-Fresnel-Prinzip 53
- Hyperopie 10
- I-PSF 183
- ICD-Modell 157
- Illumination Point-spread-function 183
- induzierte Doppelbrechung 97
- inhomogene Wellengleichung 82
- In-situ-Hybridisierung, Methode 144
- Interchromosomal-Domain-Modell 157
- Interferenz 74
 - destruktive 74
 - gleicher Dicke 260
 - gleicher Neigung 261
 - konstruktive 74
- Interferometer
 - Fizeau- 261
 - Mach-Zehnder- 264
 - Michelson- 262
 - Twyman-Green- 263
 - Wellenfrontscherung 265
- Interferometrie
 - Distanzmessung 272
 - holographische 249, 251
 - Längenmessung 272
 - optische 257
- Intracavity Absorption 121
- Iris 1
- Jet-in-Air-System 217, 225
- Kammerwasser 1
- Karies 415
- Kariesprophylaxe 427

- Katarakt 353
- Keratometer 15
 - Helmholtz- 16
 - Javal-Schiötz- 16
- Kernarchitektur, Dynamik 164
- Kerr-Lens-Modenkopplung 318
- Knochentumoren 375
- Knorpelgewebe 366
- Kohärenz
 - -länge 76, 258
 - transversale 78
 - Optik 73
 - räumliche 77, 259
 - Zeit 75, 76
- Kohlendioxid-Laser 282
- Kompositkunststoffe 427
- konfokale Fluoreszenzmikroskopie 140, 243
- konfokale Fluoreszenzrastermikroskop 182
- konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie 141
- konfokale Mikroskopie 137, 141, 239
- konfokale Multiphotonenmikroskopie 202
- konfokale Punktabbildungsfunktion 186
- konfokales Messprinzip, Vorteile 241
- Konformitätsbewertungsverfahren 438
- Kontrastempfindlichkeit 34
- konventionelle LASIK 30
- Konzentrationsmessungen 132
- Kornea 1
- kurze Laserpulse, Erzeugung 99
- Kurzpassfilter 224
- Kurzsichtigkeit 10
- Längeninterferometer 264
- Längenmessung
 - interferometrische 272
 - λ/2-Plättchen 47
 - λ/4-Plättchen 47
- Landolt-Ring 5
- Langpassfilter 224
- Laser 99
 - Ar 281
 - CO₂ 282–284
 - Excimer 30, 286
- Festkörper- 295
- HeNe 279
- Laseranwendung
 - in der Augenheilkunde 345
 - in der Zahnheilkunde 413, 423
 - Diagnostik 429
 - Hardlaser 413
 - Mundschleimhauttumoren 414
 - Softlaser 413
- Laserbehandlung 324
 - Ablation 324, 327, 331–342, 420, 422
 - Biostimulation 413, 428
 - Gewebeabtragung 327, 332, 342
 - Hyperthermie 326, 327
 - Karbonisation 327
 - Karbonisierung 417
 - Koagulation 324, 327, 424
 - Pulsdauer 323, 324, 327, 336, 337, 341
 - Femtosekunden 324, 422
 - Nanosekunden 335
 - Pikosekunden 418, 422
 - Pulsennergie 332
 - Pulslänge 416, 417, 419, 422
 - Schmelzen 417, 425, 428
 - Schneiden 414, 415, 424
 - Schweißen 428
 - Vaporisation 324, 327, 342
 - Verdampfen 417
- Laser-Gewebe-Wechselwirkungen 323
 - Klassifizierung 323
 - photoablativ 323, 324, 331, 333, 416, 417
 - photochemisch 323–325, 332, 416, 417
 - photodisruptiv 323, 324, 335, 341, 416, 418
 - photothermisch 323, 324, 326, 328, 416
 - plasmainduziert 323, 324, 335, 337–341
- laserinduzierte Fluoreszenz 111
 - Zweiniveaumodell 113
- Laser-in-situ-Keratomileusis 29
- Laserklassen 444
- Lasermassenspektroskopie 135
- Laserneurochirurgie 396
 - stereotaktische 391

- Laserpulse, kurze (Erzeugung) 99
- Laserscanning
 - fluoreszenzmikroskopie, konfokale 141
 - -tomographie 348
- Lasersicherheit 435
- Laserspektroskopiemethoden, nicht-lineare 127
- Laserstrahlung
 - Eindringtiefe 326–328, 339, 416
 - Energiedichte 324, 332, 336, 340, 416, 418
 - Intensität 323, 339
 - Laserleistung 327
 - Leistungsdichte 324, 335, 336, 416
 - UV-Strahlung 332
- Lasersysteme
 - in der Medizin 324
 - in der Zahnheilkunde 416, 419
- Lasertherapie 324
 - LITT 324
 - photodynamische Therapie 324–326
- LASIK 29
 - konventionelle 30
 - wellenfrontgesteuerte 30, 31
- Lebensdauer, effektive 115
- Lederhaut 1
- Lichtfaser 42
- Lichtmikroskopie 179
- Lichtmodulator 48
 - akustooptischer 48
 - elektrooptischer 48
- Lichtrezeptoren 2
- LIF 111
 - Zweiniveaumodell 113
- Linse 1, 41
- LITT 375
- Mach-Zehnder-Interferometer 264
- Medizinprodukte, Risikoklassen 437
- Medizinproduktegesetz, MPG 435
- metallische Beschichtungen 44
- Michelson-Interferometer 262
- Mikroskopie
 - dreidimensionale 139, 144
 - konfokale 137, 141, 239
- Modell
 - ICD 157
- Interchromosomal-Domain- 157
- Random-Walk- 156
- sphärische Subdomänen 156
- Topologie der Genomstruktur 157
- Modenkopplung 103
 - aktive 103
 - passive 105
- Modulation
 - aktive 101
 - Transferfunktion 13
- Modulator, akustooptischer 48
- Moiré-Interferometrie 19
- Molekularstrahl 123
- MTF 13
- Multiphotonenmikroskopie 187
 - 4π -konfokale 208
 - Anwendungsbeispiele 198
 - konfokale 202
 - limitierende Effekte 196
- Multiplexverfahren 49
- Myopie 10
- Nahfeldmikroskopie 181
- Nd:Glas-Laser 299
- Nd:YAG-Laser 297, 380
- Nd:YLF-Laser 299
- Netzhaut 2
 - Rezeptordichte 10
- Netzhautablösungen 353
- Netzhautlöcher 352
- nichtlineare Absorptionsspektroskopie 132
- nichtlineare Laserspektroskopiemethoden 127
- nichtlineare Optik 89
- nichtlineare Prozesse 96
- nichtlineare Suszeptibilität 94
- nichtlineare Wellenausbreitung 93
- Nipkow-Scheibe 245
- Normen 441, 442
- numerische Apertur 41, 180
- OCSA 406
- Oligo-Channel Spectrum Analyser 406
- Ophthalmometer 15
- Optical Transfer Function 13
- Optik, kohärente 73
- optische Interferometrie 257

- optische Solitonen 99
- Optische Transferfunktion 13
- Osteoid Osteoma 375, 376
- Oszillatorenstärke 117
- OTF 13
- paraxiale Wellengleichung 79
- Parodontologie 424
- Phase-locked-Verfahren 266
- Phase-shift-Verfahren 266
- Phasenanpassung
 - kritische 312
 - nichtkritische 312
 - Prinzip 311
- Phasenschiebeverfahren 266, 267
- Phasentransferfunktion 13
- Photoakustik 119
 - Spektroskopie 119
- Photodiode 49
- Photodynamische Therapie 326
- Photomultiplier 50
- photopisches Sehen 5
- photorefraktive Keratektomie 359
- photorefraktiver Speicher 253
- Pikosekundenlaser 305
- Pockel-Effekt 96
- Pockel-Zellen 47
- Point Spread Function 12, 25
 - Engineering 203, 213
- Polarisation 94
- Polarisator 46
- Polynome (Zernike) 28
- Prädissoziation 113
- Prinzip
 - Babinet- 59
 - Huygens-Fresnel- 53
- Prisma 42
- Prozesse, nichtlineare 96
- PSF 12, 25, 27
- PTF 13
- Pulpa 414
- Punktverwaschungsfunktion 12, 25
- Pupille 1
- Qualitätssicherungssystemen 438
- Quenching 113
- räumliche Kohärenz 77, 259
- radiäre Keratomie 359
- Raman-
 - -Streuquerschnitt 112
 - -Streuung 128
- Random-Walk-Modell 156
- Rasterphotogrammetrie 18
- Ray-Tracing-Sensor 23
- Rayleigh-
 - -Kriterium 8
 - -Länge 80
- reduziertes Auge 3
- Reflexion 44, 45
- refraktive Hornhautchirurgie 361
- Retina 2
- Risikoklassen 437
- RMS 26
- Rubinlaser 296
- schematisches Auge 3
- Scoliosis 365
- Sehen
 - photopisches 5
 - skotopisches 5
 - Sehschärfe 5
 - Bestimmung 5
 - Selbstphasenmodulation 98
 - Sensor, Ray-Tracing 23
 - Sklera 1
 - Sklerostomien 356
 - skotopisches Sehen 5
 - Slit-Scan-
 - -Analyse 231
 - -Photographie 18
 - -System 232
 - Snellen-Tabellen 5
 - Softlaser 413
 - Solitonen 99
 - spektrale Hochpräzisionsmikroskopie 153
 - Spektroskopie dopplerfreie 133
 - Spektroskopie Cavity-Ringdown 122
 - sphärische Aberration 9
 - sphärisches Subdomänenmodell 156
 - Stäbchen 2, 11
 - STED-Fluoreszenzmikroskop 212
 - Stereotaxie 395
 - Bestrahlungstechniken 394
 - Laserneurochirurgie 391
 - Lasersonde 400
 - Strahlentherapie 394

- Stimulated Emission Depletion
 - Microscope 212
- Stokes-Shift 112
- Stoßlöschen 113
- Strahlentherapie, stereotaktische 394
- Strahltaille 79
- Streak-Kamera 50
- Strehl-Zahl 13
- Streulichtmessungen 223
- Stroma 358
- Suszeptibilität 83, 84
 - nichtlineare 94
- T*₁-Methode 385
- T*₁-time 385
- technische Normen 435, 440
 - für Laser in der Medizin 440
- Totalreflexion 43
- Trabekelwerk 356
- Transmission 39, 40, 48
- transversale Kohärenzlänge 78
- Tscherning-Aberrometer 22
- TurboFLASH 385
- Twyman-Green-Interferometer 263
- ultrakurze Pulse 294
- Ultrakurzpulsar 305
- Verstärkung 93
- Verzögerungsplatte 47
- vibronische Festkörperlaser 300
- Videokeratograph 16
- Visual Acuity 5
- Visual Charts 5
- Visus 5
- Voronoi-Tessellierung 146
- Wärmeausdehnung 41
- Weißlichtinterferometrie 276
- Weitsichtigkeit 10
- Welle
 - ebene 79
 - elektromagnetische 89
 - Kugel- 79
- Wellenausbreitung
 - lineare 90
 - nichtlineare 93
- Wellenfrontanalyse 19
- wellenfrontgesteuerte LASIK 30, 31
- Wellenfrontkarte 26
- Wellenfrontscherungsinterferometer 265
- Wellenfrontsensor 22
 - Hartmann-Shack 19
- Wellengleichung 78
 - inhomogene 82
 - paraxiale 79
- Wellenleiter 43
- Wellenzahl 89
- Zahnüberempfindlichkeiten 425
- Zahmbein 414
- Zahnmark 414
- Zahnschmelz 414
- Zapfen 2, 11
- zeitliche Kohärenz 75
- Zeitmittelholographie 252
- Zernike-
 - -Koeffizienten 26
 - -Polynome 28
- Zertifizierungsstelle 436
- Zweiphotonen-
 - -absorption 124
 - -mikroskopie 187
- Zweistrahlinterferenz 259
- Zweiwellenlängenverfahren 275