

Ein bildgebendes Quantenkaskadenlaser-Spektrometer zur intraoperativen Gewebedifferenzierung in der chirurgischen Onkologie

Von der Fakultät Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.) genehmigte
Abhandlung

Vorgelegt von

Dipl.-Ing. Univ. Florian Benedikt Geiger

aus Bamberg

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. A. M. Herkommer
Mitberichter: Prof. Dr. med., Dr. med. habil. H. A. E. J. Feußner
Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2015

Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart

2015

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als Doktorand am Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart sowie während meiner Forschungstätigkeiten bei der Siemens AG (CT RTC SET INT-DE).

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Alois Herkommer, für die wissenschaftliche und wohlwollende Betreuung sowie die Freiheit, mit der ich meine Arbeit gestalten konnte.

Herrn Prof. Dr. Hubertus Feußner danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit sowie für seine Bereitschaft, den Mitbericht zu übernehmen.

Herrn Dr. Martin Kördel und Herrn Dr. Anton Schick danke ich ausdrücklich für die zahlreichen fachlichen und persönlichen Gespräche, für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Ansprechmöglichkeit zu jeder Zeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dr. Klaus Körner für zahlreiche Gespräche und die Sicht eines erfahrenen Wissenschaftlers. Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiasek danke ich für die Bereitstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben. Zudem danke ich allen Mitarbeitern der Siemens SET-Forschungsgruppen INT und CPS, die mich bei der Erstellung meiner Arbeit unterstützt haben. Besonders hervorheben möchte ich Martin Weber für die Unterstützung im Bereich der digitalen Datenerfassung. Meinen Doktorandenkollegen, insbesondere Peter Rentschler, Karl Fendt und Simon Thiele, danke ich für vielfältige, nicht nur fachliche Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere Leonie Ruhnau, meinen Eltern und meinen Geschwistern, die durch ihre jederzeitige Unterstützung wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

München, im Juli 2015

Florian Geiger

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Formelzeichenverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
Zusammenfassung in englischer Sprache (Abstract)	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Motivation und Problemstellung	2
1.2.1 Notwendigkeit der exakten Tumorentfernung	2
1.2.2 Begrenzte intraoperative Unterscheidungsmöglichkeit zwischen gesundem und tumorösem Gewebe	3
1.3 Stand der Technik: Tumorerkennungsverfahren in der Chirurgie	4
1.3.1 Intraoperative Schnellschnittuntersuchung	4
1.3.2 Etablierte Bildgebungsverfahren und Fluoreszenzmarker	5
1.3.3 Kritik am Stand der Technik	6
1.4 Stand der Forschung: Tumorerkennung durch Spektroskopie im mittleren Infra- rotbereich	7
1.4.1 Vergleich mit anderen Verfahren der optischen Spektroskopie	7
1.4.2 Einzelpunktspektren von unpräpariertem Gewebe	9
1.4.3 Hyperspektrale Bildgebung von präpariertem Gewebe	11
1.4.4 Erkenntnisgewinn aus dem Stand der Forschung	14
1.5 Eigene Forschungsziele	15
2 Grundlagen der Gewebespektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR)	17
2.1 Grundlagen der Molekülspektroskopie	17
2.1.1 Einordnung in elektromagnetisches Spektrum	17

2.1.2	Molekülschwingungen	18
2.1.3	Generieren eines Spektrums	20
2.2	Strahlungsquellen	22
2.2.1	Quantenkaskadenlaser (QCL)	22
2.2.2	Sonstige Strahlungsquellen	23
2.3	Spektrometerprinzipien	25
2.3.1	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR-Spektrometer) . . .	25
2.3.2	Dispersive Spektrometer	25
2.4	Messmethoden	27
2.4.1	Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)	27
2.4.2	Transmission, Diffuse Reflexion und Transflexion	34
2.5	Strahlungsdetektoren	35
2.5.1	Grundprinzipien	35
2.5.2	Bauweisen photoelektrischer Detektorsysteme	35
2.6	Hyperspektrale Bildgebung und Datenverarbeitung	36
2.6.1	Hyperspektrale Bildgebung	36
2.6.2	Bildverarbeitung hyperspektraler Daten	37

3 Lösungsansatz: Bildgebende MIR-Spektroskopie mit Quantenkaskadenlasern und ATR 40

3.1	Zielsetzung und erwartete Lösungseigenschaften	40
3.2	Spektrometerkonzept	41
3.2.1	Lösung der Wasser- und Bewegungsproblematik	41
3.2.2	Spektrometerprinzip und Strahlungsquelle	44
3.2.3	Bildgebungsprinzip und Strahlungsdetektion	46
3.3	Konzept der spektralen Bildaufnahme mittels simultaner Detektion	47
3.3.1	Spektrenberechnung	48
3.3.2	Bildgenerierung	54
3.4	Potenzielle Strahlenbelastung des Patienten	57
3.5	Unterscheidungsmerkmale des Lösungskonzepts	60
3.6	Laboraufbau	61
3.6.1	Verwendete Komponenten	61
3.6.2	Ablauf einer Messung	70
3.7	Bildgebungseigenschaften des Spektrometers	76
3.7.1	Ortsauflösung	76
3.7.2	Spektrale Auflösung	81
3.7.3	Rauschen	82

4	Ergebnisse der Gewebedifferenzierung durch hyperspektrale Bildgebung	89
4.1	Computergestützte Simulation des Einflusses von Wasserschichtdickenvariation	89
4.1.1	Ziel der Simulation	89
4.1.2	Konzeptionelles Modell: Beschreibung abgeschwächter Totalreflexion durch komplexen Brechungsindex	89
4.1.3	Mathematisches Modell: Abgeschwächte Totalreflexion an einer Dreifachschicht	90
4.1.4	Realisiertes Computermodell	94
4.1.5	Simulationsergebnisse und Modellvalidierung	102
4.1.6	Aussagen der Simulation	110
4.1.7	Diskussion des Simulationsmodells	111
4.2	Hyperspektrale Bildgebung von Tumorgewebe	111
4.2.1	Material und Methoden	112
4.2.2	Ergebnisse der Messung eines ersten Gallengangskarzinoms der Leber	116
4.2.3	Ergebnisse der Messung eines zweiten Gallengangskarzinoms der Leber	122
4.2.4	Ergebnisse der Messung eines Adenokarzinoms der Niere	126
4.2.5	Ergebnisse der Messung einer Karzinommetastase der Lunge	128
4.2.6	Ergebnisse der Messung eines neuroendokrinen Karzinoms des Hirns	131
4.2.7	Einfluss der Wasserschichtdickenvariation	134
4.2.8	Verwendete spektrale Marker	136
4.2.9	Richtige und falsche Klassifikation	136
5	Diskussion und Ausblick	141
	Literaturverzeichnis	146

Abkürzungsverzeichnis

ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D1	Detektor 1
DFG	Differenzfrequenzerzeugung
DR	Diffuse Reflexion
FPA	Focal Plane Array (Arraydetektor)
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot(-Spektrometer)
GE	Germanium
HE	Hämatoxylin-Eosin
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellurid (Mercury Cadmium Telluride)
MIR	Mittlerer Infrarotbereich
MRT	Magnetresonanztomographie
M1	Messung 1
NIR	Naher Infrarotbereich
OP	Operationssaal
OPO	Optisch parametrische Oszillatoren
PC	Hauptkomponente (Principal Component)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
QCL	Quantenkaskadenlaser
RNA	Ribonukleinsäure
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (Signal-to-Noise Ratio)
TE	Thermoelektrisch
ZnSe	Zinkselenid
5-ALA	5-Aminolävulinsäure

Verzeichnis der wichtigsten Formelzeichen

α	Absorptionskoeffizient in m^{-1}
A	Absorbanz (ohne Einheit)
c	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum in m s^{-1}
c_1	Konstante in W m^2
c_2	Konstante in m K
$C_{t/g}$	Faktor der modellierten erhöhten Absorption von Tumorgewebe gegenüber gesundem Gewebe (ohne Einheit)
d	Wasserschichtdicke in m
d_f	Laserfokusdurchmesser in m
d_p	Eindringtiefe der evaneszenten Welle in m
D^*	Spezifische Detektivität in $\text{cm Hz}^{1/2} \text{W}^{-1}$
e	Euler'sche Zahl (ohne Einheit)
E	Energie in J
\mathbf{E}_0	Vektor der elektrischen Feldstärkenamplitude in V m^{-1}
\mathbf{E}_{in}	Einfallendes elektrisches Feld in V m^{-1}
\mathbf{E}_r	Reflektiertes elektrisches Feld in V m^{-1}
\mathbf{E}_{tr}	Transmittiertes elektrisches Feld in V m^{-1}
\mathbf{E}^{ges}	Elektrisches Gesamtfeld V m^{-1}
η_q	Quantenwirkungsgrad (ohne Einheit)
Δf	Elektrische Bandbreite in Hz
ϕ	Phasenverschiebung aufgrund optischer Weglängenunterschiede in rad bzw. $^\circ$
F_b	Bestrahlte Fläche in m^2
h	Planck-Konstante in J s
H_p	Pulsbezogene Energie pro Fläche in J m^{-2}
i	Imaginäre Einheit
I	Intensität in W m^{-2}
I_k	Mittlere Laserstrahlungsintensität in W m^{-2}

I_{M1D1}	Mit Detektor D1 bei Messung M1 aufgenommenes Einkanalspektrum (wellenzahlabhängige Intensität) in $W m^{-2}$
$I_{R,M1D1}$	Dunkelstromrauschintensität, aufgenommen bei Messung M1 mit Detektor D1 in $W m^{-2}$
$I_{0,D1}$	Mit Detektor D1 aufgenommenes Einkanalspektrum in $W m^{-2}$
\mathbf{k}	Wellenvektor im Vakuum in m^{-1}
k^x	x -Komponente des Wellenvektors in cm^{-1} bzw. m^{-1}
k^z	z -Komponente des Wellenvektors in cm^{-1} bzw. m^{-1}
κ	Absorptionsindex (Imaginärteil des Brechungsindex) (ohne Einheit)
λ	Wellenlänge im Vakuum in m
n	Brechungsindex (ohne Einheit)
\tilde{n}	Realteil des Brechungsindex (ohne Einheit)
$\tilde{\nu}$	Wellenzahlvektor im Vakuum in cm^{-1} bzw. m^{-1}
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl im Vakuum in cm^{-1} bzw. m^{-1}
ν	Frequenz in Hz
$N_{p,Laser}$	Anzahl der während eines Laserpulses emittierten Photonen (ohne Einheit)
$N_{e,Laser}$	Anzahl der durch Laserphotonen entstehenden Elektronen im Detektormaterial (ohne Einheit)
$N_{R,e,Laser}$	Anzahl der durch Photonenrauschen bedingten Rauschelektronen (ohne Einheit)
$N_{p,Dunkel}$	Anzahl der dunkelstromrauschäquivalenten Photonen (ohne Einheit)
$N_{e,Dunkel}$	Anzahl der Dunkelstromelektronen (ohne Einheit)
NEP	Rauschäquivalente optische Leistung (Noise Equivalent Power) in W
ω	Kreisfrequenz in s^{-1}
Ω	Raumwinkel in sr
π	Kreiszahl bzw. in Form eines Index Kennzeichnung parallel polarisierter Strahlung (ohne Einheit)
ψ	Phasenverschiebung der stehenden Welle im einfallsseitigen Halbraum in rad bzw. $^\circ$
P_k	Mittlere Strahlungsleistung in W
P_p	Laserpulsspitzenleistung in W
Q_{D1}	Quotient aus Hintergrund- und Probenspektrum für Detektor 1 (ohne Einheit)
r_{12}^σ	Reflexionskoeffizient im Falle zwei aneinander grenzender Medien 1 und 2 für senkrecht polarisierte Strahlung (ohne Einheit)

r_{12}^{π}	Reflexionskoeffizient im Falle zwei aneinander grenzender Medien 1 und 2 für parallel polarisierte Strahlung (ohne Einheit)
ρ	Erweiterter Reflexionskoeffizient für eine Dreifachschicht (ohne Einheit)
R_{12}^{σ}	Reflektivität im Falle zwei aneinander grenzender Medien 1 und 2 für senkrecht polarisierte Strahlung (ohne Einheit)
R_{12}^{π}	Reflektivität im Falle zwei aneinander grenzender Medien 1 und 2 für parallel polarisierte Strahlung (ohne Einheit)
R_{123}	Reflektivität für eine Dreifachschicht (ohne Einheit)
σ	In Form eines Index Kennzeichnung senkrecht polarisierter Strahlung (ohne Einheit)
t	Zeit in s
t_p	Laserpulslänge in s
t_{12}	Transmissionskoeffizient (ohne Einheit)
ϑ	Winkel der Laserstrahlungsveränderung in rad bzw. °
T	Temperatur in K
Θ_1	Einfallswinkel in Medium 1 in rad bzw. °
Θ_2	Ausfallswinkel in Medium 2 in rad bzw. °
Θ_{1C}	Kritischer Einfallswinkel in Medium 1 in rad bzw. °
\mathbf{x}	Ortsvektor in m
x, y, z	Ortskoordinaten in m

Zusammenfassung

Zentrales Ziel der chirurgischen Onkologie ist i. d. R. die vollständige Entfernung (Resektion) eines Tumors, um Rückfälle (Rezidive) zu vermeiden. Tumoren werden daher in den meisten Fällen mit ausreichendem Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe entfernt. Dem gegenüber steht, dass zur Schonung des Patienten die Resektion von so wenig Gewebe wie möglich angestrebt wird.

Diese beiden Aspekte lassen sich am besten miteinander in Einklang bringen, wenn ein Tumor möglichst exakt entlang seiner Grenze entnommen wird. Voraussetzung dafür ist jedoch eine klare Identifizierung von tumorösen und gesunden Bereichen. Tumoren sind allerdings häufig sowohl optisch als auch haptisch schlecht von ihrem Umgebungsgewebe abzugrenzen, weswegen Hilfsmittel zur Gewebedifferenzierung notwendig sind.

Bisher verfügbare Systeme zur Gewebedifferenzierung sind nur eingeschränkt in einer Operationsumgebung (intraoperativ) nutzbar, beispielsweise aufgrund ionisierender Strahlung (z.B. Computertomographie), herausfordernder gerätetechnischer Umsetzung (z.B. Magnetresonanztomographie) oder geringer räumlicher Auflösung (z.B. Sonographie).

Um diese Nachteile des Stands der Technik zu vermeiden, ist der Ansatz der vorliegenden Arbeit Gewebedifferenzierung durch hyperspektrale Bildgebung im mittleren Infrarotbereich (MIR) mit dem Ziel des Einsatzes am lebenden Gewebe (in vivo).

Die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen tumorösem und gesundem Gewebe durch hyperspektrale Bildgebung im MIR wurde durch verschiedene Forschungsgruppen nachgewiesen. Bei den in diesen Untersuchungen verwendeten Proben handelte es sich jedoch um aufwändig vorbehandelte und getrocknete Gewebeschnitte, die sich vor allem aufgrund der dadurch bedingten Abwesenheit von Wasser entscheidend anders verhalten als lebendes bzw. frisches Gewebe. Für die Untersuchungen wurden zudem etablierte Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer (FTIR-Spektrometer) verwendet, die aufgrund ihrer Größe, ihres Gewichts sowie der benötigten Stickstoffkühlung nur begrenzt das Potenzial zeigen, intraoperativ eingesetzt zu werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Spektrometer entwickelt, das die Messung von frischen, ungetrockneten (nativen) Proben ermöglicht und das potenziell für intraoperative Messungen am lebenden Gewebe eingesetzt werden kann.

Die zwei zentralen Elemente des entwickelten Spektrometers sind zum einen die Verwendung von erst seit Kurzem erhältlichen breit durchstimmbaren Quantenkaskadenlasern (QCLs) und zum anderen die Verwendung abgeschwächter Totalreflexion (ATR).

Breit durchstimmbare QCLs bieten im Hinblick auf die genannte Anwendung diverse Vorteile gegenüber FTIR-Spektrometern, wie z.B. geringeres Gewicht, geringere Größe oder einfachere Handhabbarkeit und zeigen somit das Potential, intraoperativ als Teil eines handgeführten Geräts eingesetzt zu werden.

Die Verwendung von ATR bietet darüber hinaus die Möglichkeit, auf der Oberfläche nativer Proben befindliches Wasser zu verdrängen und somit auch an nativen Proben hyperspektrale Bildgebung im MIR durchzuführen.

Anhand des realisierten QCL-Spektrometers wurde an frisch entnommenen Tierproben unter Laborbedingungen gezeigt, dass mit dem verwendeten spektroskopischen Verfahren im Gegensatz zum Stand der Forschung eine bildgebende Differenzierung auch von nativem tumorösem und gesundem Gewebe möglich ist. Mit Fortschreiten der neuartigen Technologie breitbandiger Quantenkaskadenlaser kann diese Erkenntnis in Zukunft dazu genutzt werden, ein intraoperatives Bildgebungssystem zu schaffen, das eine Identifizierung von Tumorbereichen unmittelbar vor der Gewebeentfernung (Resektion) *in vivo* und in Echtzeit ermöglicht. Ein solches Assistenzsystem würde Chirurgen bei der exakten Tumorsektion unterstützen und so zu maximal schonenden Eingriffen führen. Es könnten die Zahl der Rückfälle (Rezidive) gesenkt, die Rehabilitationszeit verkürzt und die Kosten des Krankheitsverlaufs reduziert werden.

Abstract

The main objective in surgical oncology is usually the complete removal (resection) of a tumor in order to avoid recurrence. This means that in most cases tumorous tissue is removed along with a rim of normal tissue around it (safety margins). However, because resection of as little tissue as possible is important to reduce negative effects on patients, the optimal procedure is to remove a tumor exactly along its border. To ensure this, clear identification of tumorous and healthy regions is necessary. Most tumors, however, are hard to differentiate from the tissue around them both optically and haptically. Therefore tissue differentiating devices are needed.

Available medical imaging technology shows limitations concerning intraoperative use. The reasons for this are, for example, ionizing radiation (e.g. computed tomography), challenging device implementation (e.g. magnetic resonance tomography) and poor resolution (e.g. sonography).

To avoid these disadvantages, this thesis presents an approach that includes tissue differentiation by using hyperspectral imaging in the mid infrared region (MIR), aiming for in vivo use. The differentiation of tumorous and healthy tissue by hyperspectral imaging in the MIR has been shown by various research groups. The tissue used for those experiments, however, was dried and therefore showed significantly different spectral behavior compared to fresh or in vivo tissue. Furthermore those experiments were conducted using prevalent Fourier transform infrared (FTIR) spectrometers. Those devices have limited potential to be used intraoperatively due to their size, weight and need for liquid nitrogen cooling.

For these reasons, a spectrometer was developed in this thesis that allows imaging of fresh and undried (native) tissue and shows the potential for intraoperative use.

The two main elements of the spectrometer are, firstly, the use of novel broadly tunable quantum cascade lasers (QCLs) and, secondly, the use of attenuated total reflection (ATR).

QCLs are significantly lighter, smaller and easier to handle than FTIR spectrometers and therefore show the potential to be used intraoperatively as part of a handheld device.

ATR additionally allows hyperspectral imaging of native samples in the MIR. The reason for this is that the thickness of water layers on a fresh tissue's surface can be minimized by pressing an ATR crystal onto the sample.

Laboratory experiments using the developed spectrometer show that, in contrast to the results of research mentioned above, differentiation of native tumorous and healthy animal tissue is indeed feasible. Using advanced broadband QCLs in the future, these findings can be used for an intraoperative imaging system that allows in vivo and real time identification of tumor areas immediately before resection. Such a device would help surgeons to minimize safety margins and thus reduce negative effects on the patient. Recurrence rates could be decreased, as well as the time for convalescence and medical expenses.

1 Einleitung

1.1 Einführung

In ihrem Weltkrebsbericht prognostiziert die Weltgesundheitsorganisation WHO einen weltweiten Anstieg der jährlichen Krebsneuerkrankungen von 14 Millionen im Jahr 2012 auf geschätzte 22 Millionen innerhalb von zwei Jahrzehnten. Dem Bericht nach führen die durch diesen Trend verursachten Kostensteigerungen zur Überforderung selbst reichster Volkswirtschaften [WHO14]. Eine Kostenreduktion bei Krebsbehandlungen ist daher notwendig. Erreicht werden kann dies beispielsweise durch Verfahren, die gleichwertig teurere ersetzen, oder durch Methoden, die Tumorrezidive¹ verringern und somit Behandlungskosten reduzieren [DISD09]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Verfahren, das die Erfüllung dieser beiden Aspekte zum Ziel hat.

Der Forschungsbereich der Onkologie beinhaltet nach [Psc12] die Untersuchung der „Entstehung und Behandlung von Tumoren und tumorbedingter Krankheiten“. Die bedeutendste onkologische Therapie fest umschriebener, bösartiger Tumoren ist dabei nach [HBKD08a, S. 213 ff.] die chirurgische Tumorentfernung. Voraussetzung für einen solchen operativen Eingriff ist die bildgebende Diagnostik, beispielsweise durch Sono-, Computer- oder Magnetresonanztomographie [HBKD08b, S. 9]. Aus verschiedenen Gründen, wie Strahlenbelastung oder Kosten, werden diese etablierten medizinischen Bildgebungsverfahren jedoch nur eingeschränkt intraoperativ² eingesetzt [MJM⁺13, LS12]. Chirurgen sind daher aufgrund limitierter haptischer und visueller Beurteilungsmöglichkeiten nur begrenzt in der Lage, während einer Tumorsektion³ zwischen krankem und gesundem Gewebe zu unterscheiden. Mögliche Folgen sind eine Beeinträchtigung des Patienten bei übermäßiger Gewebeentfernung, z.B. im Gehirn, oder aber das Wiederauftreten von Tumorwachstum bei unvollständiger Entfernung [LS12, LASF⁺01].

¹„Wiederauftreten eines histologisch gleichartigen Tumors am gleichen Ort oder im gleichen Organ nach vorausgegangener radikaler Behandlung“ [Psc12].

²Während einer Operation [Psc12]

³Tumorentfernung [Psc12]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein Ansatz vorgestellt, durch den in Zukunft eine intraoperative Unterscheidung zwischen krankem und gesundem Gewebe *in vivo*⁴ ermöglicht werden soll. Grundlage des Ansatzes ist dabei die Spektroskopie im Bereich des mittleren Infrarots (MIR). Besonders berücksichtigt wurde das spätere Einsatzgebiet Operationsaal. Im Hinblick darauf fanden bestimmte Technologien Anwendung, die diesbezüglich hohes Potenzial aufweisen. Beispielsweise kamen erst seit Kurzem verfügbare breit durchstimmbare Quantenkaskadenlaser (QCL) zum Einsatz, die u. a. aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichts in Zukunft als Teil handgeführter Geräte verwendet werden können. Durch die hohen Strahlungsleistungen dieser Laser ist zudem die Verwendung einfach handhabbarer thermoelektrisch gekühlter Detektoren möglich. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung abgeschwächter Totalreflexion (ATR) die spektrale Untersuchung im mittleren Infrarotbereich von frischem, ungetrocknetem und somit auch lebendem Gewebe.

1.2 Motivation und Problemstellung

1.2.1 Notwendigkeit der exakten Tumorentfernung

Als bedeutendste Therapieform solider⁵ maligner⁶ Tumoren gilt nach [HBKD08a, S. 213 ff.] die chirurgische Tumorentfernung (Tumoresektion). Andere Verfahren wie z.B. Strahlen- oder medikamentöse Therapien werden dabei häufig in Kombination mit der Tumorchirurgie angewandt [HBKD08a, S. 213].

Das zentrale Ziel der chirurgischen Therapie ist i. d. R. die vollständige Entfernung des Tumors, um ein Tumorrezidiv zu vermeiden [MYI00, LASF⁺01, CMH⁺04, SRG⁺07, BSPF⁺07, SH07, Jac08, DISD09, SGS⁺09, GHP⁺13, YSZ14] [HBKD08a, S. 214] [KBK⁺08, S. 214] [BDHM08a, S. 169]. Beispielsweise untersuchten [LASF⁺01] den Krankheitsverlauf von 416 Patienten mit Hirntumoren des hochmalignen Typs *Glioblastom*. Wurde über 98% des Tumolvolumens entfernt, so war die mediane Überlebenszeit ca. eineinhalb Mal so hoch wie bei Resektionen von unter 98% des malignen Gewebes. Aus diesem Grund wird neben dem Tumorgewebe häufig zusätzlich den Tumor umgebendes gesundes Gewebe entfernt, um einen Sicherheitsabstand zu gewährleisten [HBKD08a, S. 214].

Der Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand steht jedoch gegenüber, dass die zusätzliche Entfernung funktionalen Gewebes, z.B. bestimmter Gehirnbereiche, zu einer zusätzlichen

⁴Im lebenden Organismus [Psc12].

⁵Solide Tumoren sind fest umschriebene Tumoren, z.B. Karzinome von Organen wie Leber oder Niere. Bei nichtsoliden Tumoren hingegen liegt „systemische autonome Zellproliferation (Zellwucherung) einzelner Zellen vor (z.B. Leukämien)“ [HBKD08a, S. 203].

⁶Bösartig, im Gegensatz benignen (gutartigen) Tumoren [Psc12].

Beeinträchtigung des Patienten führt. Daher ist in diesem Fall die Entfernung von so wenig gesundem Gewebe wie möglich günstig [LASF⁺01, SRG⁺07, KSSK10, DML⁺13]. In bestimmten Fällen werden infiltrative⁷ Gehirntumoren sogar bewusst nur teilweise entfernt, um Patienten maximale Zeit ausreichender Lebensqualität statt maximale Lebenszeit zu ermöglichen [HW11, LS12, Duf14].

Die beiden oft widersprüchlichen Notwendigkeiten, zum einen vollständige Tumorentfernung, zum anderen Entfernung von so wenig gesundem Gewebe wie möglich, lassen sich am besten miteinander in Einklang bringen, wenn der Tumor genau entlang der Grenze zwischen normalem und tumorösem Gewebe entfernt wird [DML⁺13, KSSK10]. Dafür ist eine klare Identifizierung dieser Grenze zwischen den Gewebearten notwendig.

1.2.2 Begrenzte intraoperative Unterscheidungsmöglichkeit zwischen gesundem und tumorösem Gewebe

Grundlage der Zellvermehrung ist der Zellzyklus, im Rahmen dessen die genetische Information einer Zelle identisch verdoppelt (Replikation) und auf zwei Tochterzellen verteilt wird [RHND06, S. 366, S. 512]. Bei der Regulation des Zellzyklus kann es auf verschiedenen Ebenen zu Fehlern kommen, beispielsweise bei der Signalübertragung oder bei Kontrollmechanismen der Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Replikation [BDHM08b, S. 48 f.]. Eine mögliche Folge solcher Regulationsstörungen ist die Entstehung von Tumorzellen, die sich unkontrolliert vermehren [BDHM08a, S. 167 f.]. In Bezug auf ihr Erscheinungsbild unterscheiden sich diese Zellen von ihrem Ursprungsgewebe durch sogenannte *Atypien*, wie z.B. Variabilität von Zell- und Zellkerngrößen [BDHM08a, S. 169 f.]. Diese Merkmale sind somit zunächst Veränderungen auf zellulärer Ebene [BDHM08a, S. 169] und daher für das menschliche Auge unsichtbar⁸, zumal Zellen ungefärbt für das menschliche Auge weitestgehend kontrastlos erscheinen [BDHM08a, S. 11 ff.] [Psc12, S. 594].

Neben mikroskopischen Veränderungen gibt es bei bestimmten Tumoren jedoch auch Veränderungen, die zu makroskopischer Sichtbarkeit von Tumorbereichen führen. Beispielsweise bilden sich um benigne Tumoren oft sichtbare fibröse⁹ Kapseln, die den Tumor klar zum Umgebungsgewebe abgrenzen [BDHM08a, S. 168]. Auch maligne Tumorbereiche können sichtbar sein. Beispielsweise haben nach [BDHM08a, S. 169, S. 202] Karzinome¹⁰ in soliden Organen

⁷Infiltrative bzw. invasive Tumoren sind maligne Tumoren, die in das umgebende gesunde Gewebe hineinwachsen. Benigne Tumoren hingegen wachsen verdrängend [HBKD08a, S. 201] [BDHM08a, S. 168, S. 193].

⁸Der Durchmesser der meisten menschlichen Zellen beträgt nach [LDD⁺06, S. 1-42] ca. 7 – 20 µm, das Auflösungsvermögen des Auges liegt nach [ST07, S. 155] bei bestenfalls etwa 75 µm

⁹„Aus faserigem Bindegewebe bestehend“ [Psc12]

¹⁰Karzinom ist ein „vom Epithel ausgehender maligner Tumor“ [Psc12]. Epithelgewebe ist „ein geschlossener Zellverband, der innere oder äußere Körperoberflächen bedeckt [Psc12].“

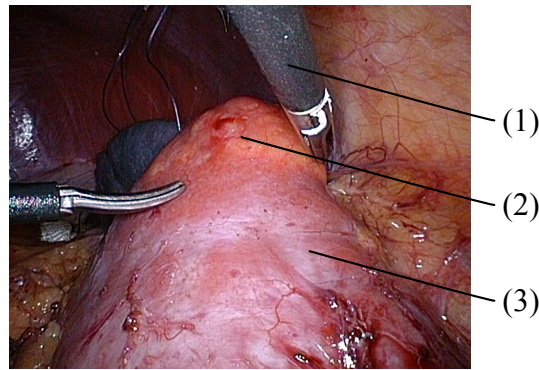


Abbildung 1.1: Begrenzte Unterscheidungsmöglichkeit zwischen gesundem (3) und tumorösem (2) Nierengewebe im Übergangsbereich der beiden Gewebearten. Im Bild zu sehen sind zudem Operationswerkzeuge (1). Bild entnommen aus [GGLS12].

(z.B. Brustdrüsengewebe, Magen) ein „grauweißes“, oder muzinöse (schleimbildende) Karzino-
me ein „glasig-transparentes“ Aussehen [BDHM08a, S. 204]. Auch können aufgrund man-
gelnder Nährstoffversorgung abgestorbene Tumorbereiche (Nekrosen) makroskopisch sichtbar
sein [BDHM08a, S. 207] [Psc12], genauso wie die Ausbildung von gefäßhaltigem Stützgewebe
(Tumorstroma) für die Nährstoffversorgung [BDHM08a, S. 168].

Trotz teilweiser makroskopischer Sichtbarkeit ist jedoch auch bei diesen Tumoren die Abgren-
zung zum umgebenden Gewebe in den Randbereichen oft nicht eindeutig [BDHM08a, S. 168 f.],
wie in Abbildung 1.1 gezeigt. Ein Chirurg ist daher oft nur begrenzt in der Lage, Tumorgewebe
von normalem Gewebe zu unterscheiden [FSE⁺11, LS12].

1.3 Stand der Technik: Tumorerkennungsverfahren in der Chirurgie

1.3.1 Intraoperative Schnellschnittuntersuchung

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, werden Tumoren in vielen Fällen mit ausreichendem Sicher-
heitsabstand im gesunden Gewebe entfernt, um Rezidive zu vermeiden. Der Chirurg orientiert
sich in diesem Fall an begrenzten visuellen und haptischen Eindrücken [HBKM08, S. 710], teil-
weise auch unter Einbezug intraoperativer Bildgebung (s. Abschnitt 1.3.2). Dabei wird nach
[HBKD08a, S. 214] versucht, den Tumor möglichst als zusammenhängendes Gewebe zu entfern-
en, um eine Verschleppung von Tumorzellen und daraus resultierende Rezidiven zu verhindern
(„No-touch-Technik“).

Im Rahmen einer Schnellschnittuntersuchung wird das entfernte Gewebe unmittelbar nach der
Entnahme in ein pathologisches Labor überbracht, dort in ca. 4 bis 7 µm dicke Schichten ge-

schnitten, mit Färbemitteln wie z.B. Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt und unter einem Lichtmikroskop histopathologisch¹¹ untersucht [KBL⁺13] [BDHM08c, S. 11 f., S. 15 f.]. Durch die Untersuchung wird festgestellt, ob die Ränder des entfernten Gewebes tumorfrei sind, d.h. ob der Tumor vollständig entfernt wurde [BDHM08c, S. 15 f.].

Nach [BDHM08a, 169 f.] werden Tumorzellen von gesunden Zellen unter anderem unterschieden durch Variabilität von Zellgröße und -form (Zellpolymorphie), vergrößertes und stärker anfärbares Kernchromatin¹² aufgrund eines erhöhten Nukleinsäuregehalts der Tumorzellkerne (Kernhyperchromasie), oder einer vermehrten zytoplasmatischen¹³ Basophilie¹⁴ der Tumorzellen, d.h. einer Umstellung vom normalen „Funktionsstoffwechsel zum Proliferationsstoffwechsel¹⁵ mit Vermehrung des zytoplasmatischen Ribonukleinsäure(RNA)-Gehalts“ [BDHM08a, S. 170].

Nach [LDD⁺06, K2, S. 147] wird die Operation bis zum Ergebnis der Schnellschnittuntersuchung in vielen Fällen unterbrochen. Die Dauer einer Schnellschnittuntersuchung beträgt meist zwischen 20 und 40 min [BDHM08c, S. 16] [GHP⁺13, YSZ14].

1.3.2 Etablierte Bildgebungsverfahren und Fluoreszenzmarker

Zur leichteren Identifikation von Tumorgrenzen werden klassische medizinische Bildgebungsverfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Sonographie eingesetzt. Beispielsweise werden im Rahmen der Neuronavigation präoperativ¹⁶ erstellte Bilder von CT, MRT oder PET in Verbindung mit Navigationsalgorithmen genutzt, um Tumorbereiche intraoperativ zu lokalisieren. Zwischen Bildaufnahme und Tumorentfernung können sich operationsbedingt anatomische Veränderungen ergeben, die teilweise durch intraoperative Bildgebung, v.a. mittels CT oder MRT, korrigiert werden [WST⁺06, MJM⁺13, FSE⁺11, WK98, LS12, KSS⁺14, HW11, JRV⁺07, SFMF13, RMG⁺10]. Dies geschieht teilweise auch unter Verwendung von Kontrastmitteln [MJM⁺13, KSS⁺14, SFMF13, PDB⁺07].

Sonographie kann zur intraoperativen Identifizierung von Tumorgrenzen eingesetzt werden, beispielsweise bei partiellen (teilweisen) Nierenresektionen [Gil06, S. 47, S. 55 f.] [UOK⁺08, Uki10, SLB⁺11] [Car07, S. 50].

¹¹Die Histopathologie ist die „Lehre von den unter dem Mikroskop erkennbaren krankhaften Veränderungen der Körpergewebe“ [Psc12].

¹²Anfärbbare Substanz im Zellkern, im Wesentlichen bestehend aus Nukleinsäuren (z.B. DNA) und Kernproteinen [Psc12]

¹³„Zytoplasma“ beschreibt das „Zellplasma; von einer Zellmembran umschlossenes Plasma der Zelle“ [Psc12].

¹⁴Vermehrung basophiler (mit basischen Farbstoffen anfärbbar) Leukozyten (weiße Blutkörperchen) im Blut“ [Psc12]

¹⁵Proliferation beschreibt eine Wucherung [Psc12].

¹⁶„Vor einer Operation stattfindend“ [Dud05]

Ein weiteres Verfahren zur verbesserten intraoperativen Tumorerkennung ist die Verwendung von Fluoreszenzmarkern wie beispielsweise *5-Aminolävulinsäure* (5-ALA), die dem Patienten vor oder während einer Operation zugeführt werden. Dadurch können z.B. in der Neurochirurgie bestimmte Hirntumoren (z.B. hochmaligne Gliome) mithilfe eines entsprechenden Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden [SPM⁺06, SHM⁺11, SFMF13].

1.3.3 Kritik am Stand der Technik

Bei der **intraoperativen Schnellschnittdiagnostik** sind Tumorentnahme im Operationsaal (Therapie) und Untersuchung des entfernten Gewebes in der Pathologie (Diagnose) räumlich und zeitlich voneinander getrennt. Dieses Verfahren bietet dem Chirurgen somit keine intraoperative Tumorerkennung am lebenden Gewebe, weswegen es nur bedingt zur Minimierung der Sicherheitsabstände im gesunden Gewebe beiträgt.

Nachteile von **Computertomographie** und **Positronen-Emissions-Tomographie** sind Belastung durch ionisierende Strahlung sowie hohe Gerätekosten [MJM⁺13] [Kra07, S. 312].

Die Kosten für **Magnetresonanztomographie** sind nach [Kra07, S. 312] noch höher als für Computertomographie, was die intraoperative Anwendung nach [SGS⁺09, LS12, MJM⁺13] begrenzt. Bei einem intraoperativen Einsatz verursacht das hohe Magnetfeld zudem Probleme bezüglich vorhandener magnetischer Gegenstände, wie z.B. Operationswerkzeuge [HW11, LS12].

Ein Nachteil der **Sonographie** ist die geringe Auflösung. Selbst bei Verwendung von Sonden mit relativ hohen Frequenzen von beispielsweise 7,5 MHz und der damit verbundenen hohen Auflösung [Kra07, S. 313, S. 341] sind nach [UG09, S. 8] Tumoren in der Praxis nur bis zu einem Durchmesser von etwa 3 mm zu erkennen.

Ein Nachteil **fluoreszenzbasierter Interventionen** ist, dass bestimmte Tumoren, z.B. nicht hochmaligne Gliome, auf verwendete Kontrastmittel wie 5-ALA nur begrenzt mit Fluoreszenzen reagieren [EFF⁺11, FSE⁺11, SK14]. Ein weiterer Nachteil bei Verwendung von Kontrastmitteln ist die zusätzliche Beeinträchtigung des Patienten. Beispielsweise werden bei [FSE⁺11] aufgrund einer möglichen phototoxischen Hautreaktion Patienten für 24 Stunden ab Verabreichung von 5-ALA keinen Lichtquellen ausgesetzt.

1.4 Stand der Forschung: Tumorerkennung durch Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich

1.4.1 Vergleich mit anderen Verfahren der optischen Spektroskopie

Diverse Verfahren der optischen Spektroskopie haben das Potenzial die in Abschnitt 1.3.3 genannten Nachteile des Stands der Technik wie z.B. hohe Kosten, Platzprobleme, Strahlungsbelastung oder räumliche und zeitliche Trennung von Diagnose und Therapie zu umgehen. Bei diesen Verfahren handelt es sich beispielsweise um Spektroskopie im mittleren oder nahen Infrarotbereich, um die Nutzung von Autofluoreszenz¹⁷ oder um Raman-Spektroskopie¹⁸. Diverse Publikationen^{19,20,21} zeigen die Eignung dieser Verfahren hinsichtlich der Unterscheidung zwischen krankem und gesundem Gewebe.

Die Energieniveaus im Bereich des mittleren Infrarots (MIR) entsprechen den Grundschnwingungen des Großteils der Moleküle, die für die Spektroskopie von biologischem Gewebe relevant sind (s. Abschnitt 2.1) [EG06]. Da es sich um Grundschnwingungen handelt, ist es in diesem Spektralbereich möglich, Moleküle charakteristischen Absorptionsbanden zuzuordnen [SM00]. Im Gegensatz dazu dominieren im Bereich des Nahinfrarots (NIR) Kombinations- und Oberschnwingungen. Dies führt im Vergleich zum MIR zu breiten und daher stark überlappenden Absorptionsbanden, weswegen die Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Stoffgruppen schwieriger ist [SM00, KIBH⁺09] [GH07, S. 6]. Die MIR-Spektroskopie ermöglicht daher eine einfachere Unterscheidung verschiedener Stoffklassen als die NIR-Spektroskopie. Insbesondere im sogenannten *Fingerprintbereich* des MIR zwischen ca. 1800 und 900 cm^{-1} (s. Kapitel 2) ist eine Unterscheidung verschiedener Stoffe und somit Gewebearten aufgrund charakteristischer Spektren vergleichsweise gut möglich [SM00, EG06, LB05, KIBH⁺09].

Der zentrale Nachteil der MIR-Spektroskopie ist der starke Wassereinfluss auf die mit diesem Verfahren generierten Spektren. Wasser ist im Bereich des mittleren Infrarots stark absorbierend und erschwert daher eine Untersuchung ungetrockneter Proben erheblich [SH08, S. 100] [KS06, DKI⁺08, KIBH⁺09, MC10, SSK⁺11]. Dieser Einfluss existiert auch im NIR-Bereich, jedoch in geringerem Maße [YWMG87].

Die Tumorerkennung mittels Autofluoreszenz basiert auf bestimmten fluoreszierenden körpereigenen Markern, die in Tumorgewebe stärker auftreten als in gesundem Gewebe [OOSY03,

¹⁷Fluoreszenz körpereigener Stoffe bei Anregung durch eine externe Lichtquelle [OOSY03, JWD12, Psc12]

¹⁸Spektroskopie basierend auf inelastischer Streuung von Photonen [Ban83, KIBH⁺09, WN05]

¹⁹Spektroskopie im nahen Infrarot: [HSK⁺02, WYT⁺94, YSH⁺03]

²⁰Raman-Spektroskopie: [ABD⁺07, ABD⁺09, BZL⁺11, BB04, LLC07, LHC09, Liu11, SZH⁺09, TPM⁺06, KSSK10, GFRC⁺11, SSK⁺11]

²¹Autofluoreszenz: [JWD12, Ber03, DBWR05, HMZ⁺08, IHH⁺05, OOSY03, PGP⁺03, Sha09, WCC⁺99]

JWD12]. Das Verfahren bietet daher im Vergleich zur MIR- bzw. NIR-Spektroskopie keine spektral aufgelöste Information der chemischen Zusammensetzung und weist einen diesbezüglich geringeren Informationsgehalt auf.

Raman-Spektroskopie ermöglicht, genauso wie MIR-Spektroskopie, die Aufnahme von Spektren im mittleren Infrarotbereich. Für dieses Verfahren gilt daher ebenfalls der in Bezug auf MIR-Spektroskopie genannte Vorteil des hohen Informationsgehalts. Vorteile der MIR- gegenüber der Raman-Spektroskopie sind jedoch nach [KIBH⁺09, EG06, SSK⁺11] das höhere Signal-Rausch-Verhältnis bei gleicher Messdauer sowie die bezüglich eines Einsatzes am lebenden Gewebe (in vivo) geringeren Sicherheitsbedenken. Letztere resultieren aus den für die Raman-Spektroskopie notwendigen vergleichsweise starken Lasern.

Der genannte Nachteil der MIR-Spektroskopie bezüglich der Wasserproblematik gilt im Vergleich zu Raman-Spektroskopie noch in stärkerem Maße als im Falle der NIR-Spektroskopie. Wasser streut in der relevanten Spektralregion vergleichsweise schwach, weswegen Raman-Spektroskopie für ungetrocknete Proben gut geeignet ist [KIBH⁺09, SSK⁺11, EG06, SK14, MRR08].

Aufgrund der genannten Vorteile wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR) verwendet. Die Auswahl dieses Verfahrens war nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Publikationen zum Thema Unterscheidung zwischen tumorösem und gesundem Gewebe durch MIR-Spektroskopie. In den folgenden Abschnitten werden zwei Herangehensweisen betrachtet:

- Nicht bildgebende Messungen an nativem, unbehandeltem Gewebe. Im Hinblick auf die genannte Wasserproblematik ist hierbei der für die vorliegende Arbeit relevante Aspekt die Spektrengenerierung von weitestgehend ungetrocknetem Gewebe.
- Bildgebende Messungen an getrocknetem Gewebe. Die Messungen wurden an getrocknetem Gewebe durchgeführt, um die genannte Wasserproblematik zu umgehen. Der für die vorliegende Arbeit relevante Aspekt ist hier die Bildgebung.

Referenzen zu weiteren, nicht bildgebenden Messungen an getrocknetem Gewebe oder Zellen finden sich bei den unter dieser Fußnote²² angegeben Publikationen.

Für das Verständnis der beiden folgenden Abschnitte ggf. notwendige Grundlagen der Spektroskopie, insbesondere zu den Themen Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) und abgeschwächte Totalreflexion (ATR), finden sich in Kapitel 2.

²²[RMGW90, WR90, WPR91, RW92, MWT⁺96, WQT⁺98, GFC99, SAR⁺01, GDP⁺03, SSCS⁺03, FMAK04, Mor04, MDS⁺07, PDB⁺07, BAMH08, DKI⁺08, BGB⁺08, STB08, BDD⁺10, MTJ⁺10, RMRD10, CCK11, Hug11, XLG⁺11, GHP⁺13, BWRG14]

Tabelle 1.1: Publikationen im Bereich Tumorerkenkung durch *Einzelpunkt*-MIR-Spektroskopie an nativem Gewebe. Gruppenzugehörigkeit erfolgt nach gleichen Autoren oder Instituten. **GZ**: Gewebezustand: „frisch“, „luftgetrocknet“ oder „aufgetaut“ nach unmittelbarem Einfrieren nach Resektion. Messort: „n.a.“, wenn in Publikation nicht beschrieben; „in situ“, wenn Gewebe nicht aus Organismus entfernt; „OP“ bei Messung direkt im Operationsaal, aber nach Entfernung aus Organismus; „Labor“ bei Messung außerhalb des OPs nach Entfernung. **SB**: Verwendeter Spektralbereich.

Gruppe	Autor	Gewebe	GZ	Messort	SB in cm^{-1}
A	[WXS ⁺ 01]	Mund	frisch	n.a.	4000–800
B	[BWZM02]	Darm	frisch	n.a.	1245–1145, 1045–995
A	[LXZ ⁺ 05]	Darm	in vivo	in situ	4000–800
C	[NHW ⁺ 09]	Darm	frisch, luftg.	Labor	1800–900
A	[LXL ⁺ 11]	Schilddrüse	frisch	OP	4000–1000
A	[SXW ⁺ 13]	Lunge	aufgetaut	Labor	4000–1000
D	[SK14]	Hirn	frisch	OP	4000–400
A	[YSZ14]	Darm	frisch	OP	4000–1000

1.4.2 Einzelpunktspektren von unpräpariertem Gewebe

Die Autoren der in diesem Abschnitt vorgestellten Publikationen verfolgten zwei unterschiedliche Ziele: Zum einen die Entwicklung von Systemen zur intraoperativen Unterscheidung zwischen malignem und gesundem Gewebe²³, zum anderen die Entwicklung von Systemen zur Tumorfrüherkennung²⁴.

Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick über die vorgestellten Publikationen. Die Zuordnung zu Forschungsgruppen geschah auf Grundlage identischer Autoren oder Forschungsinstitute. In Bezug auf die erwähnte Wasserproblematik im MIR wird in der Spalte „Gewebezustand“ das Gewebe als „frisch“ bezeichnet, wenn dies so von den Autoren angegeben wurde, d.h. wenn das Gewebe unmittelbar nach der Entnahme vermessen wurde, oder wenn keine mögliche Lufttrocknung erwähnt ist. Der Gewebezustand wird zusätzlich als „luftgetrocknet“ bezeichnet, wenn der Publikation eine entsprechende Trocknung vor der Messung eindeutig zu entnehmen ist.

Für die Gewebeuntersuchungen wurden Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (s. Abschnitt 2.3) in Kombination mit abgeschwächter Totalreflexion (s. Abschnitt 2.4.1) verwendet. Eine Ausnahme bildet [BWZM02] durch die Verwendung von Bleisalzkrystalllasern (s. Abschnitt 2.2.2) als Lichtquelle und diffuser Reflexion (s. Abschnitt 2.4.2) als Messmethode.

Die spektralen Auflösungen betragen zwischen 2 cm^{-1} und 8 cm^{-1} , wobei bei der Messung mit Bleisalzkrystalllasern [BWZM02] keine Auflösung angegeben wurde. Die Dauern der Einzelpunktmessungen betragen in etwa zwischen 1 und 3 min [LXZ⁺05, LXL⁺11, YSZ14].

²³[BWZM02, LXZ⁺05, LXL⁺11, SXW⁺13, SK14, YSZ14]

²⁴[WXS⁺01, NHW⁺09]

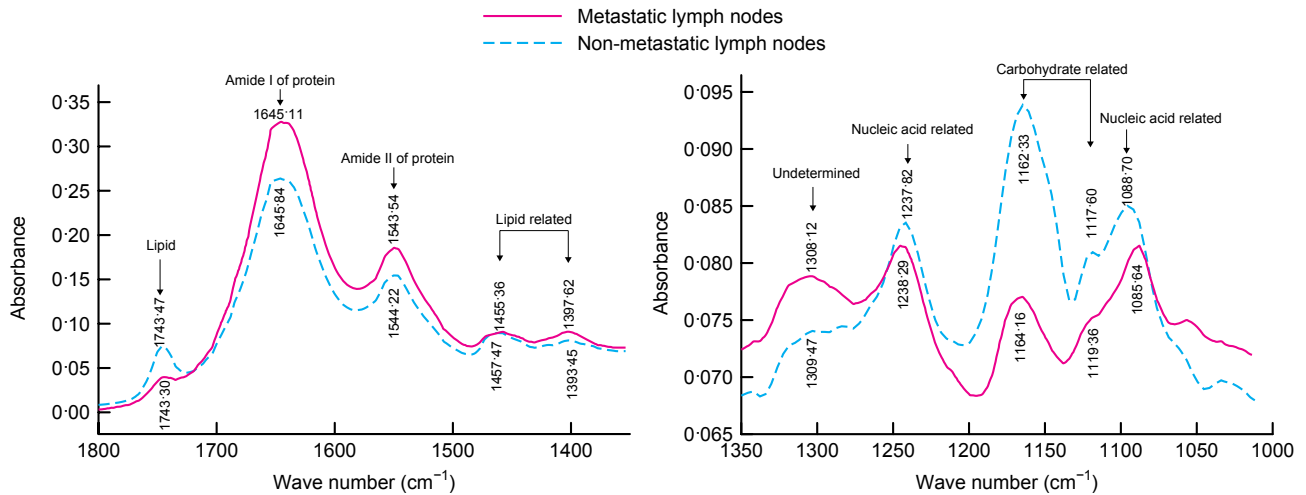


Abbildung 1.2: Beispielhafte Spektren aus der Literatur von nativem gesundem und tumorösem Gewebe (metastasiertes Lymphknotengewebe). Gezeigt ist die Zuordnung bestimmter Banden zu den biochemischen Stoffklassen Lipide (lipid), Proteine (protein), Kohlenhydrate (carbohydrate) und Nucleinsäuren (nucleic acid). Entnommen aus [LXL⁺11]. Nach [FTE⁺06] schwingen auch bestimmte Lipidbestandteile bei den Wellenzahlen um 1238 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} (s. Abschnitt 1.4.4).

Spektrale Unterschiede zwischen krankem und gesundem Gewebe sind vor allem zurückzuführen auf die Konzentrationsveränderung biochemischer Stoffklassen, d.h. auf Veränderungen bei Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren [MC10, LXZ⁺05, KSSS04]. Wie in Abschnitt 1.4.4 näher beschrieben, existiert jedoch kein für alle Tumorarten gültiger spektraler Marker. Je nach Tumorart, Patient oder auch Tumorstadium variieren durch Stoffklassenveränderung verursachte spektrale Unterschiede. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Publikationen aus Tabelle 1.1 im Hinblick auf biochemische Veränderungen zusammengefasst. Orientierung bieten dabei die in Abbildung 1.2 gezeigten Spektren des in Abschnitt 1.4.1 erwähnten Fingerprintbereichs. Ein Spektrum des gesamten MIR-Bereichs bis 4000 cm^{-1} findet sich z.B. bei [LXL⁺11].

- [WXS⁺01, LXZ⁺05, LXL⁺11, SK14, YSZ14] beschreiben reduzierte Lipidanteile in Tumorgewebe bei den Wellenzahlen im Bereich zwischen etwa 3010 und 2850 cm^{-1} , im Bereich von 1745 cm^{-1} und bei ca. 1460 cm^{-1} .
- [WXS⁺01, YSZ14] beschreiben erhöhte Proteinanteile in Tumorgewebe bei den Wellenzahlen um ca. 1650 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} . Dem gegenüber steht ein bei [LXZ⁺05, SXW⁺13] beobachteter reduzierter Proteinanteil im gleichen Wellenzahlenbereich.
- [LXL⁺11, SK14, NHW⁺09] beschreiben reduzierte Kohlenhydratanteile in Tumorgewebe bei der Wellenzahl 1165 cm^{-1} und im Bereich um 1060 cm^{-1} .

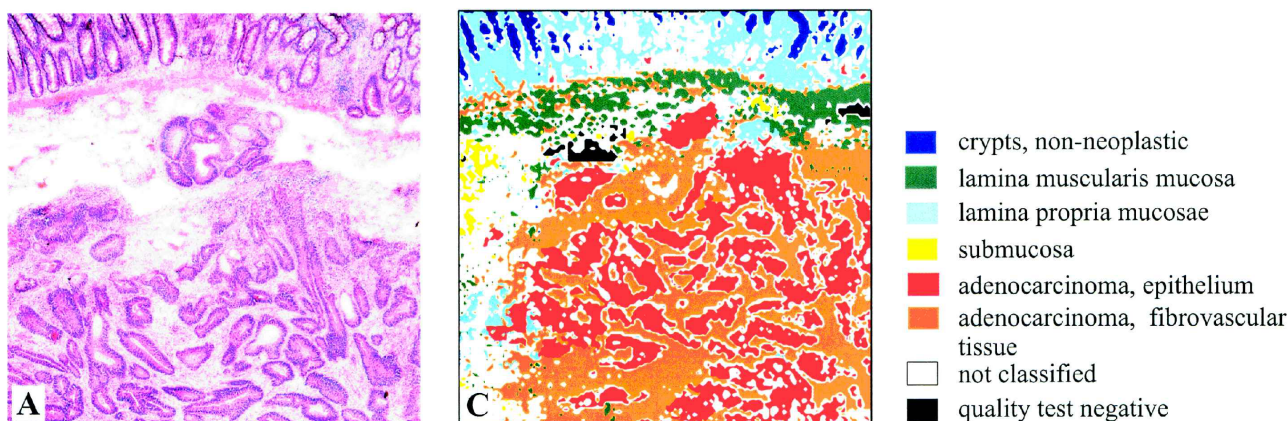


Abbildung 1.3: Links: Fotografie der vergrößerten Ansicht eines mit Hämatoxylin-Eosin (s. Abschnitt 1.3.1) gefärbten Gewebeschnitts eines malignen Darmtumors (Adenokarzinom). Die Größe des Gewebeschnitts beträgt ca. $3 \times 3 \text{ mm}^2$. Rechts: Ergebnis der hyperspektralen Bildgebung (s. Abschnitt 2.6) des im linken Bild gezeigten, jedoch ungefärbten Gewebeausschnitts. Der Bereich des Adenokarzinoms wird durch die Farben rot bzw. orange beschrieben. Ein Pathologe erkennt im linken Bild den tumorösen Bereich z.B. anhand veränderter Zellformen. Entnommen aus [LHL⁺02].

- [WXS⁺01, LXL⁺11, SK14, YSZ14] beobachten erhöhte Anteile an Nukleinsäuren in Tumorgewebe bei den Wellenzahlen 1240 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} .

1.4.3 Hyperspektrale Bildgebung von präpariertem Gewebe

Die in Tabelle 1.2 aufgeführten Publikationen zielen vornehmlich auf eine formalisierte, digitale Histopathologie. Bei diesem Verfahren handelt es sich um die spektroskopische Untersuchung von Gewebeschnitten im Labor als Ersatz für klassische histopathologische Färbemethoden (s. Abschnitt 1.3.1). Das Ergebnis einer digitalen Histopathologie ist beispielhaft in Abbildung 1.3 gezeigt.

Für die Gewebeuntersuchungen wurden FTIR-Spektrometer in Kombination mit Transmission als Messmethode (s. Abschnitt 2.4.2) verwendet. Ausnahmen bilden [BWZM02] bzw. [WCY⁺04, BBL⁺09, BMR⁺12, WKM14], die als Messmethoden diffuse Reflexion bzw. Transflexion (s. Abschnitt 2.4.2) verwendeten.

Die gemessenen Gewebeschnitte waren zwischen $2 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ dick. Eine Ausnahme bildet [BWZM02] mit verwendeten Gewebeschnitten einer Dicke zwischen $300 \mu\text{m}$ und $500 \mu\text{m}$.

In Tabelle 1.2 sind verschiedene Gewebestände angegeben. Bei paraffiniertem Gewebe handelt es sich um Gewebe, das nach der Entnahme u.a. für histopathologische Untersuchungszwecke in Paraffin eingebettet wurde [Psc12]. Da Paraffin im Fingerprintbereich spektrale Sichtbarkeit zeigt [WTN⁺08], wurde das Gewebe bei manchen Messungen entparaffiniert. Dieser Vorgang

kann jedoch die stoffliche Gewebezusammensetzung verändern, z.B. durch Herauslösen von Lipiden [BBL⁺09, KSG⁺06]. Ebenfalls verändernd in Bezug auf die spektrale Messung kann die Verwendung von Einfriermedium wirken [KSG⁺06]. Vergleichsweise wenig verfälschende Vorgehensweisen sind das Pressen des unbehandelten Gewebes auf die gewünschte Dicke oder die Stickstoffkühlung ohne Medium mit anschließendem Schneiden des Gewebes in einem Mikrotom²⁵.

Wie Tabelle 1.2 zu entnehmen ist, sind bezüglich des untersuchten Spektralbereichs zwei prinzipielle Herangehensweisen zu beobachten: Zum einen die Untersuchung des Bereichs beginnend bei ca. 4000 cm^{-1} und endend bei ca. 800 cm^{-1} , zum anderen Untersuchung des Bereichs beginnend bei ca. 1800 cm^{-1} und endend bei ca. 800 cm^{-1} . Manche Autoren²⁶ generieren zwar Spektren über den größeren Bereich, verwenden aber nur den kleineren Bereich für die Auswertung. Ein möglicher Grund dafür ist die hohe Informationsdichte des Fingerprintbereichs zwischen ca. 1800 und 900 cm^{-1} (s. Kapitel 2).

Die spektralen Auflösungen der Messungen liegen zwischen 4 cm^{-1} und 16 cm^{-1} ; die gewählten Auflösungen werden von den einzelnen Autoren nicht näher begründet.

Die Messdauer wird in der Mikrospektroskopie durch die Art der Bildgenerierung beeinflusst. Beispielsweise wird bei [SGS⁺09] als Messdauer für ein scannendes System (s. Abschnitt 2.6) ein Zeitraum von 60 min zur Generierung von 600 Spektren angegeben, d.h. 6 s pro Spektrum. Bei Verwendung eines Arraydetektors (FPA, s. Abschnitt 2.6) wird in der gleichen Publikation ein Zeitraum von 4 min für 4096 Spektren angegeben, d.h. 0,06 s pro Spektrum. Bei [WKM14] wird die Messdauer für ein scannendes System mit ca. 10 h für ca. 3500 Spektren angegeben, d.h. ca. 1 min pro Spektrum. In der gleichen Publikation wird bei Verwendung eines FPAs ein Zeitraum von 10 min für 65 536 Spektren angegeben, d.h. ca. 0,01 s pro Spektrum.

Analog zu Abschnitt 1.4.2 werden im Folgenden stofflich begründete Unterschiede zwischen gesundem und krankem Gewebe zusammengefasst:

- Von den Gruppen F, I, J, K, M und N wurde eine Reduktion des Lipidgehalts gemessen. Dies äußerte sich in einer reduzierten Absorption bei den Wellenzahlen im Bereich von ca. 3010 cm^{-1} bis 2850 cm^{-1} , bei ca. 1740 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} und bei 1080 cm^{-1} .
- In Bezug auf Proteine werden keinen klaren einheitlichen Aussagen getroffen.
- Die Gruppen E und H beschreiben einen Anstieg des Kohlenhydratlevels, der sich im Bereich zwischen 1045 cm^{-1} und 1030 cm^{-1} äußert. Gruppe G beschreibt hingegen einen reduzierten Kohlenhydratgehalt, ohne auf konkrete Wellenzahlen einzugehen.

²⁵„Präzisionsapparat zur Herstellung sehr dünner Schnitte von Geweben zur histologischen Untersuchung“ [Psc12]

²⁶z.B. [BAL⁺08, BBL⁺09, WKM14]

Tabelle 1.2: Publikationen im Bereich Tumorerkennung durch bildgebende MIR-Spektroskopie an getrocknetem Gewebe. „Zervix uteri“ beschreibt den Gebärmutterhals. **FG**: Forschungsgruppe, Zuordnung erfolgt nach gleichen Autoren oder Instituten. **GZ**: Gewebezustand: „p“ für paraffiniert; „ep“ für entparaffiniert; „m,a“ für Verwendung eines Einfriermediums; „a“ für Einfrieren ohne Medium; „g“ für gepresst; „f,l“ für frisch, aber luftgetrocknet. **SB**: Verwendeter Spektralbereich. **AB**: Art der Bildgenerierung: „F“ für Focal Plane Array (FPA); „S“ für Scannen; „F,S“ für Kombination von FPA und Scannen. **BG**: Bildgröße. **OA**: Ungefähre Ortsauflösung.

FG	Autor	Gewebe	GZ	SB in cm^{-1}	AB	BG in mm^2	OA in μm
E	[YOG ⁺ 00]	Lunge	p	4000–950	S	$0,2 \times 0,2$	10
B	[BWZM02]	Darm	g	4000–900	S	3×2	100
B	[BWZM02]	Darm	f,l	2000–950	S	6×5	400
F	[LHL ⁺ 02]	Darm	a	3500–900	S	3×3	20
B	[BGM ⁺ 03]	Darm	a	4000–900	S	3×3	100
G	[CHW ⁺ 03]	Zervix uteri	a	1800–950	S	$1,2 \times 0,9$	30
F	[FLBH03]	Brust	a	1900–1000	F,S	$0,26 \times 0,5$	10
H	[GDP ⁺ 03]	Prostata	ep	4000–750	F	$0,4 \times 0,4$	6,5
I	[KSSS04]	Hirn	a	4000–950	S	$9,5 \times 6,5$	90
F,J	[LHND04]	Darm	a	1850–950	S	$1,8 \times 1,8$	91
J,K	[WCY ⁺ 04]	Zervix uteri	p	1800–800	S	$0,5 \times 0,5$	10
I	[BSS ⁺ 05]	Hirn	a	1800–1000	F	$0,27 \times 0,27$	4,7
L	[FBHL05]	Prostata	ep	4000–720	F,S	$0,7 \times 0,7$	6,3
M	[ABD ⁺ 06]	Hirn	a	4000–720	F,S	$1,5 \times 0,9$	93
I	[KSG ⁺ 06]	Hirn	m,a	3800–950	F,S	9×5	63
M	[BAL ⁺ 08]	Hirn	a	4000–720	F,S	6×6	25
N	[ALC ⁺ 08]	Hirn	a	4000–900	S	$1,5 \times 1,5$	25
M	[WTN ⁺ 08]	Darm	p	2000–650	S	$1,6 \times 1,6$	10
I	[SGS ⁺ 09]	Hirn	a	n.a.	S	4×4	180
J	[BBL ⁺ 09]	Lymphknoten	ep	4000–700	F,S	1×1	6,3
M	[TPW ⁺ 10]	Darm	p	1800–900	S	$1,2 \times 1,2$	6,5
J	[BMR ⁺ 12]	Lunge	p	1800–900	F,S	1×1	6,3
M	[NPD ⁺ 13]	Darm	a	4000–750	F,S	$1,2 \times 1,2$	6,3
K	[WKM14]	Zervix uteri	p	4000–950	F,S	$1,9 \times 1,5$	10

- Die Gruppen E, F, G, J und K beschreiben einen Anstieg der Nukleinsäuren. Es werden dabei die Wellenzahlen um 1230 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} genannt.

1.4.4 Erkenntnisgewinn aus dem Stand der Forschung

In den vorangegangenen Abschnitten wurden spektrale Unterschiede zwischen tumorösem und gesundem Gewebe beschrieben, die auf Veränderungen bei Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren zurückzuführen sind.

Zwar ist die in Abbildung 1.2 gezeigte Zuordnung biochemischer Stoffklassen zu bestimmten Banden möglich, jedoch können umgekehrt bestimmte Banden nicht eindeutig bestimmten Stoffklassen zugeordnet werden. Gründe dafür sind, dass ein bestimmtes Molekül in unterschiedlichen Stoffklassen vorkommen kann oder dass unterschiedliche Moleküle im gleichen Spektralbereich schwingen. Beispielsweise schwingen sogenannte „symmetrische Streckschwingungen“²⁷ der in Nukleinsäuren enthaltenen Phosphodiesterbindungen²⁸ bei ca. 1080 cm^{-1} . Diese Bindung ist jedoch nach [FTE⁺06] ebenfalls in bestimmten Lipiden enthalten, weswegen auch diese Lipide zur Schwingung bei ca. 1080 cm^{-1} beitragen können [FLBH03, KSG⁺06, KSSS04]. Dies führt dazu, dass keine klare Aussage darüber getroffen werden kann, ob in Tumorgewebe bei 1080 cm^{-1} prinzipiell erhöhte oder reduzierte Absorption vorliegt, da sowohl erhöhte Nukleinsäureanteile als auch reduzierte Lipidanteile mögliche Erklärungen für spektrale Unterschiede zwischen tumorösem und gesundem Gewebe sind (s. Abschnitte 1.4.2 und 1.4.3) [KSSS04].

Erhöhte Nukleinsäureanteile entstehen in tumorösem Gewebe aufgrund einer erhöhten Zellvermehrungsgeschwindigkeit (s. Abschnitte 1.2.2 und 1.3.1) [KSSS04]. Mögliche Erklärungen für reduzierte Lipidanteile hingegen sind zum einen der lokale Abbau von Fettzellen aufgrund des durch den erhöhten Tumorstoffwechsel bedingten höheren Nährstoffverbrauchs, zum anderen die Ausnahme der Fettzellen von der Zellproliferation²⁹ [WXS⁺01, BAL⁺08, LXZ⁺05]. Für die Unterscheidung zwischen gesundem und tumorösem Gewebe im Rahmen der im Stand der Technik beschriebenen Schnellschnittuntersuchung werden ebenfalls Veränderungen betrachtet, die beispielsweise aus einem erhöhten Nukleinsäuregehalt oder einem erhöhten Stoffwechsel resultieren (vgl. Abschnitt 1.3.1). Spektrale Gewebeunterscheidung und klassische histopathologische Färbemethoden haben somit die Gemeinsamkeit, dass keine primären Veränderungen wie z.B. Genmutationen betrachtet werden, sondern daraus resultierende, sekundäre Effekte, wie etwa erhöhte Nukleinsäureproduktion in einer Zelle [LXZ⁺05, KSSS04].

²⁷Bestimmte Schwingungsform dreiatomiger Moleküle, s. z.B. [Sva91, S. 36]

²⁸ PO_2^- -Struktur, Verbindung aus Phosphor (P) und Sauerstoff (O)

²⁹Zellwucherung [Psc12]

Ein weiterer möglicher Grund für spektrale Unterscheidung ist eine *zellübergeordnete* Veränderung des Gewebes, wie etwa der erwähnte reduzierte Anteil an Lipidzellen in Tumorgewebe. Ein zusätzliches Beispiel ist die bei [LHND04] beobachtete reduzierte Absorption im Bereich zwischen ca. 1400 cm^{-1} und 1040 cm^{-1} für Tumorgewebe, obwohl z.B. bei ca. 1240 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} aufgrund des erhöhten Nukleinsäureanteils eine erhöhte Absorption zu erwarten gewesen wäre. Als Grund für die Reduktion wurde in der Publikation ein reduzierter Muzingehalt³⁰ im Tumorgewebe des Darms vermutet. Muzine absorbieren ebenfalls in dem genannten Spektralbereich und werden von bestimmten Drüsenzellen produziert. Die reduzierte Dichte dieser Drüsenzellen in dem untersuchten Tumorgewebe hatte einen stärkeren Effekt auf die Absorption als ein erhöhter Nukleinsäureanteil.

Diese Beispiele zeigen, dass kein allgemeingültiger „spektraler Marker“ zu existieren scheint, der eine spektrale Unterscheidung zwischen tumorösem und gesundem Gewebe über alle Tumorarten hinweg ermöglicht. Vielmehr ist es so, dass spektrale Unterschiede abhängig sind von der Tumorart und u. U. auch von Faktoren wie Tumorstadium, Patientengeschlecht oder Patientenalter [LHL⁺02, FBHL05] [Hug11, S. 85].

1.5 Eigene Forschungsziele

Die in den beiden Abschnitten 1.4.2 und 1.4.3 beschriebenen Publikationen zeigen, dass stoffliche Unterschiede zwischen krankem und gesundem Gewebe durch MIR-Spektroskopie messbar sind. Über alle Publikationen hinweg ist die Reduktion des Lipidgehalts und der Anstieg von Nukleinsäuren in Tumorgewebe Konsens. Über Proteine und Kohlenhydrate gibt es keine einheitlichen Aussagen, allerdings gibt es auch für diese beiden Stoffklassen je nach Gewebeart Unterschiede, die zur Gewebedifferenzierung herangezogen werden können.

Für die vorliegende Arbeit ist entscheidend, dass spektrale Unterschiede zwischen gesundem und krankem Gewebe existieren. Dass diese Unterschiede reproduzierbar sind, wird durch drei Aspekte gestützt:

- Verschiedene Forschungsgruppen zeigen ähnliche Ergebnisse,
- die Ergebnisse wiederholen sich bis zu einem gewissen Grad für verschiedene Gewebearten,
- die spektralen Unterschiede können bis zu einem gewissen Grad durch biochemische Veränderungen erklärt werden (s. Abschnitt 1.4.4).

³⁰Muzine sind Schleimstoffe, die u. a. in bestimmten Zellen des Darms vorkommen [LHL⁺02, Psc12]

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung, ob hyperspektrale Bildgebung im mittleren Infrarotbereich (MIR) ein mögliches Verfahren zur intraoperativen Tumorerkennung am lebenden Gewebe (in vivo) darstellt. Dies entspricht einer Zusammenführung der in den Abschnitten 1.4.2 und 1.4.3 vorgestellten Ansätze, da Spektroskopie an frischem, ungetrocknetem Tumorgewebe (Abschnitt 1.4.2) mit hyperspektraler Bildgebung (Abschnitt 1.4.3) kombiniert wird. Der Vorteil spektraler Bildgebung gegenüber der Generierung von Einzelpunktspektren ist, dass dem Chirurgen die Resektionslinie zwischen Tumor- und gesundem Gewebe gezeigt werden kann. Dies würde helfen, Sicherheitsabstände im gesunden Gewebe zu minimieren.

In der vorliegenden Arbeit werden daher zwei zentrale Aspekte verfolgt:

1. Die Realisierung eines bildgebenden MIR-Spektrometers, welches das Potenzial hat, für den gedachten Zweck in einem Operationssaal eingesetzt zu werden.
2. Eine experimentelle Untersuchung, ob mit dem realisierten Spektrometer frisch entnommenes, ungetrocknetes („natives“) Tumor- von gesundem Gewebe unterschieden werden kann und welche Erkenntnisse daraus in Bezug auf einen intraoperativen Einsatz gezogen werden können. Es wird natives Gewebe verwendet, um die Bedingungen von lebendem Gewebe nachzustellen.

2 Grundlagen der Gewebespektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR)

2.1 Grundlagen der Molekülspektroskopie

2.1.1 Einordnung in elektromagnetisches Spektrum

Abbildung 2.1 zeigt eine mögliche Gliederung des elektromagnetischen Spektrums. Der Infrarotbereich lässt sich dabei entsprechend Tabelle 2.1 weiter untergliedern in nahes (NIR), mittleres (MIR) und fernes (FIR) Infrarot. Die in Tabelle 2.1 verwendete Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ist in der MIR-Spektroskopie zusammen mit der Einheit $[\tilde{\nu}] = \text{cm}^{-1}$ gebräuchlich und wird daher auch in der vorliegenden Arbeit auf diese Weise verwendet. Gleichung (2.1) zeigt den Zusammenhang zwischen der Wellenzahl $\tilde{\nu}$, der Wellenlänge λ , der Frequenz ν und der Lichtgeschwindigkeit c [Ban83, S. 3 f.].

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad \text{in cm}^{-1} \text{ bzw. in m}^{-1} \quad (2.1)$$

Moleküle werden durch Photonen des mittleren Infrarotbereichs in Schwingungen und Rotationen versetzt [Ban83, S. 8]. Spektroskopie in diesem Spektralbereich wird daher als „Schwingungs-Rotations-Spektroskopie“ bezeichnet [GH07, S. 6] [ST08, S. 579]. Die Energieniveaus von Rotationsübergängen liegen allerdings deutlich unterhalb der Niveaus von Schwingungsübergängen [Sva91, S. 52], nach [Ban83, S. 82] lediglich im Bereich einiger Tausendstel. Dennoch können Rotationsübergänge im MIR eine wichtige Rolle spielen: Im

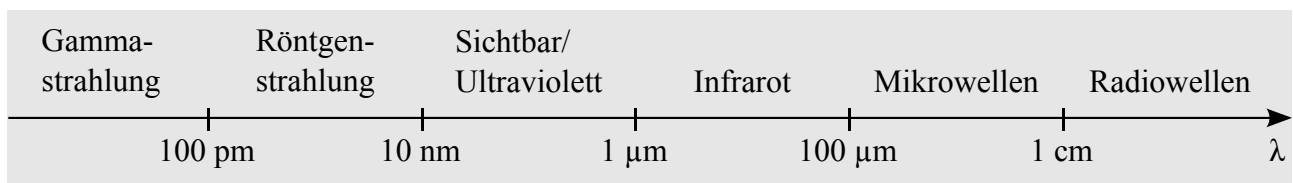


Abbildung 2.1: Mögliche Einteilung des elektromagnetischen Spektrums. Werte entnommen aus [Ban83, S. 7]

Tabelle 2.1: Mögliche Einteilung des Infrarotbereichs. Werte entnommen aus [GH07, S. 4 ff.].

	Nahes Infrarot	Mittleres Infrarot	Fernes Infrarot
λ in μm	1 bis 2,5	2,5 bis 25	25 bis 100
$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}	10 000 bis 4000	4000 bis 400	400 bis 100
ν in THz	300 bis 120	120 bis 12	12 bis 3

Spektrum erkennbare Molekülrotationsstrukturen finden sich im MIR vornehmlich bei Messungen kleinerer Moleküle in Gasphase, z.B. bei Wasserdampf oder Kohlenstoffdioxid [GH07, S. 6, S. 9]. Solche Medien, z.B. als Bestandteile von Luft, können von der Strahlung auch bei Spektroskopie einer nicht-gasförmigen Probe auf dem Weg von der Lichtquelle zur Probe bzw. zum Detektor durchlaufen werden. Erhebliche Unterschiede zwischen der Wasserdampfstrecke (z.B. 1 m) und der Strecke durch die Probe (z.B. 10 μm) können dann zu einer entsprechenden Sichtbarkeit von Molekülrotationsstrukturen im Spektrum führen¹.

Im Hinblick auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandte Spektroskopie von Festkörpern und Flüssigkeiten (feuchtes Gewebe) wird im Folgenden näher auf die im MIR dominanten Molekülschwingungen eingegangen. Näheres zu Molekülrotationen findet sich z.B. bei [Ban83, S. 42 ff., S. 82] [GH07, S. 6 ff.].

2.1.2 Molekülschwingungen

Stabile Moleküle entstehen durch Kombination mehrerer Atome unter Reduzierung der Gesamtenergie [ST08, S. 579] [Sva91, S. 29]. In einem Molekül bildet sich ein Gleichgewicht zwischen abstoßenden und anziehenden Kräften zwischen den Atomen. Es wirken abstoßende Kräfte zwischen Ladungen gleichen Vorzeichens, d.h. jeweils zwischen Atomkernen und Elektronenhüllen, und es wirken anziehende Kräfte zwischen Ladungen unterschiedlichen Vorzeichens, d.h. zwischen Atomkernen und Elektronenhüllen [Ban83, S. 72].

Wird ein zweiatomiges Molekül betrachtet und ist r der Abstand zwischen den Atomen, bildet sich für $r = r_{eq}$ ein Gleichgewicht bei minimaler Systemenergie [Ban83, S. 72 f.]. Unter Vernachlässigung quantisierter Molekülzustände kann die für eine Veränderung des Abstands r notwendige Energie durch einen anharmonischen Oszillator mithilfe des *Morse-Potenzials* beschrieben werden [Ban83, S. 74 ff.] [Ber95, S. 208 f.]. Dies ist beispielhaft in Abbildung 2.2 skizziert.

¹Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, ist der Anteil der absorbierten Strahlung proportional zur Weglänge in der Probe. Je dicker die Probe, desto höher der Anteil der absorbierten Strahlungsenergie. Eine sehr schwach absorbierende Probe (hier z.B. Wasserdampf), in der die Strahlung eine lange Strecke zurücklegt (hier z.B. 1 m) kann daher zu einer ähnlichen und sogar höheren Strahlungsabsorption führen als eine sehr stark absorbierende Probe (hier z.B. feuchtes Gewebe), in der die Strahlung aber nur eine sehr kurze Wegstrecke zurücklegt (hier z.B. 10 μm im Falle einer evaneszenten Welle, s. Abschnitt 2.4.1).

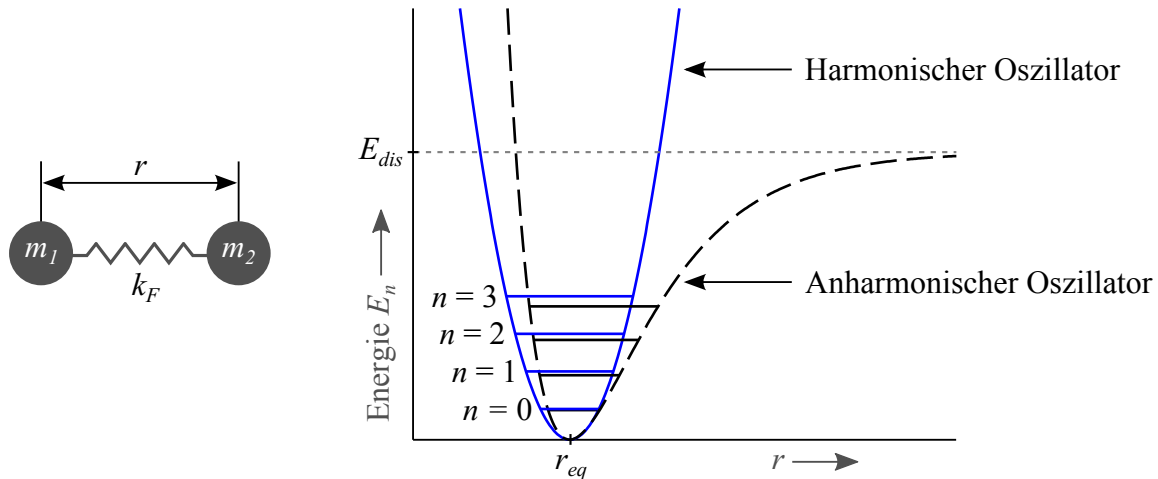


Abbildung 2.2: Für kleine Abweichungen des Atomabstands r vom Gleichgewichtszustand r_{eq} , d.h. für kleine Schwingungsamplituden, kann der harmonische Oszillator als Näherung für den anharmonischen verwendet werden. In diesem Fall kann ein zweiatomiges Molekül in Form von zwei Massen (m_1 , m_2) modelliert werden, die durch eine Feder (Federkonstante k_F) miteinander verbunden sind. Im MIR werden vor allem Grundschwingungen angeregt, d.h. Übergänge vom diskreten Niveau $n = 0$ zum diskreten Niveau $n = 1$. Im NIR werden vor allem Oberschwingungen angeregt, z.B. von $n = 0$ zu $n = 3$. Der Wert n beschreibt dabei die Quantenzahl; E_{dis} bezeichnet die Bindungsenergie des Moleküls. Abbildung in Anlehnung an [Ban83, S. 77 f.].

Bei Anregungen im mittleren Infrarotbereich handelt es sich vornehmlich um Übergänge vom Grundzustand eines Moleküls in den ersten Anregungszustand [GH07, S. 4]. Für niedrige Anregungslevel dieser Art kann das Molekülverhalten durch einen harmonischen Oszillator nach dem Hook'schen Gesetz angenähert werden, wie in Abbildung 2.2 dargestellt [Ber95, S. 208 ff.] [GH07, S. 3 f.].

Zur Beschreibung quantisierter Molekülzustände reicht jedoch die mechanische Beschreibung durch das Hook'sche Gesetz nicht aus [Ban83, S. 74]. Für niedrige Anregungsniveaus werden daher diskrete Energiezustände für eine Schwingungsfrequenz ν_{osc} näherungsweise durch Gleichung (2.2) nach Schrödinger beschrieben [Sch68, S. 115, S. 125] [GH07, S. 3 f.] [Ban83, S. 6, S. 74]. Dabei bezeichnet h die Planck-Konstante nach Gleichung (2.3) [Dem13, S. 481].

$$E_n = h\nu_{osc} \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad \text{in J; } \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (2.2)$$

$$h \approx 6,626 \times 10^{-34} \text{ J s} \quad (2.3)$$

Ein Molekül in einem Energiezustand E_0 kann demnach durch elektromagnetische Strahlung der Frequenz ν_A in einen höheren Energiezustand E_1 angeregt werden. Dafür muss das Bohr'sche Postulat nach Gleichung (2.4) erfüllt sein [Dem11, S. 10]. Die Energie der Strahlung nimmt bei

einem solchen Absorptionsvorgang um $\Delta E = E_1 - E_0$ ab [Ban83, S. 5 f., S. 76] [Ber95, S. 11].

$$\nu_A = \frac{E_1 - E_0}{h} \quad \text{in Hz} \quad (2.4)$$

2.1.3 Generieren eines Spektrums

Im Rahmen einer spektroskopischen Messung werden Photonen unterschiedlicher Frequenzen in Wechselwirkung mit einer Probe gebracht. Durch Messung der reflektierten bzw. transmittierten Photonen (s. Abschnitt 2.4) kann indirekt auf die Anzahl der absorbierten Photonen geschlossen und somit die spezifische Energielevelstruktur einer Probe ermittelt werden [GH07]. Besonders im sogenannten „Fingerprintbereich“ zwischen etwa 1800 cm^{-1} und 900 cm^{-1} können auf diese Weise Aussagen über die spezifische molekulare Zusammensetzung einer Probe getroffen und somit verschiedene Stoffe unterschieden werden. Der Name „Fingerprint“ resultiert aus der hohen spektralen Informationsdichte in diesem Bereich, in dem jede Stoffzusammensetzung über eine Art charakteristischen Fingerabdruck verfügt [EG06, KIBH⁺09].

Das Ergebnis der strahlungsfrequenzabhängigen Messung reflektierter bzw. transmittierter Strahlung wird als *Einkanalspektrum* bezeichnet [Las99]. Ein Einkanalspektrum ist beispielhaft in Abbildung 2.3a dargestellt. Es wird, neben der Energielevelstruktur der Probe, bestimmt durch die spektrale Charakteristik der Strahlungsquelle, durch spektrale Eigenschaften verwendeter optischer Elemente und ggf. durch das Absorptionsverhalten anderer Medien im Strahlengang, wie z.B. Wasserdampf. Aus einem Einkanalspektrum ist somit das Absorptionsverhalten einer Probe nicht unmittelbar abzulesen, da es u. U. von den anderen genannten Einflüssen überlagert wird. Neben dem Einkanalspektrum der Probe (Probenspektrum I_P) wird daher ein zweites Einkanalspektrum aufgenommen, bei dem keine Wechselwirkung der Strahlung mit der Probe stattfindet (Hintergrundspektrum I_H). Wie das Probenspektrum enthält das Hintergrundspektrum die spektralen Informationen von Lichtquelle, optischen Elementen und sonstigen Medien im Strahlengang, jedoch keine Information bzgl. der Probe. Somit lässt sich durch den Vergleich zwischen Hintergrund- und Probenspektrum im Idealfall die probenspezifische Information, d.h. Absorption, ermitteln.

Abbildung 2.3a zeigt beispielhaft ein Proben- und ein Hintergrundspektrum, Abbildung 2.3b das aus den beiden Einkanalspektren nach Gleichung (2.5) berechnete *Absorbanzspektrum*². Durch die Quotientenbildung I_H/I_P werden die erwähnten nicht relevanten Informationen, z.B.

²Bei [Las99, Kne01, Rot12] werden für den englischen Begriff *absorbance* als deutsche Begriffe *Extinktion* und teilweise auch *Absorption* verwendet, bei [HM05, S. 368] der Begriff *Absorbanz*. Letzterem wird im Rahmen dieser Arbeit gefolgt, um das Maß klar zum allgemeinen, nicht logarithmischen Begriff *Absorption* abzugrenzen und um im Vergleich zu *Extinktion* die Nähe zum englischen Begriff *absorbance* herzustellen, der in den einschlägigen Publikationen präsent ist.

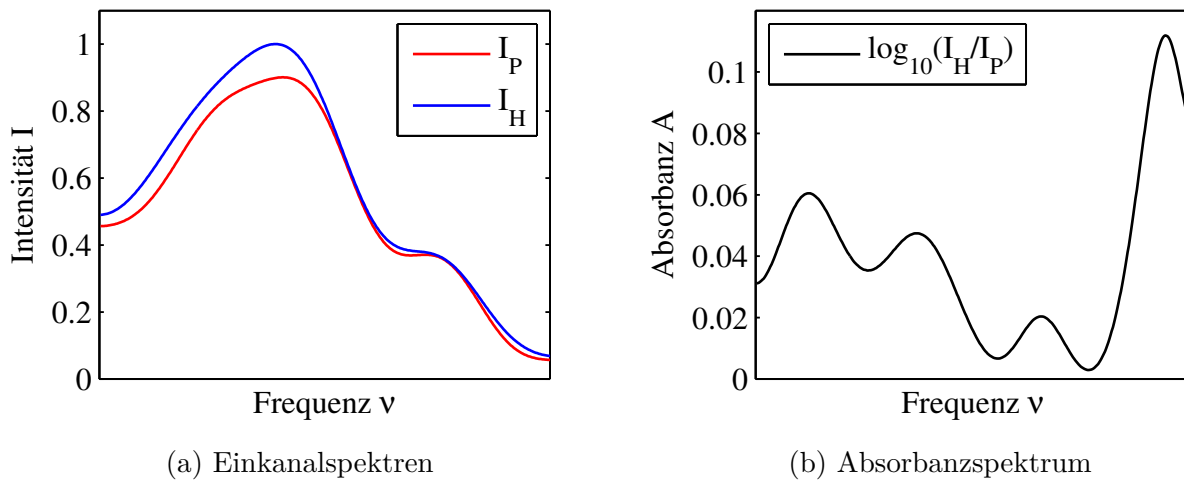


Abbildung 2.3: Beispielhafte Darstellung der Berechnung eines Absorbanzspektrums aus Hintergrundspektrum (I_H) und Probenspektrum (I_P).

der Strahlungsquelle, in der Theorie eliminiert.

$$A(\nu) = \log_{10} \frac{I_H(\nu)}{I_P(\nu)} \quad \text{ohne Einheit} \quad (2.5)$$

Das logarithmische Maß der Absorbanz wird verwendet, da es nach dem in Gleichung (2.6) gezeigten Gesetz nach Bouguer, Lambert und Beer („Beer’sches Gesetz“) mit Einschränkungen linear zur Konzentration des untersuchten Stoffes ist [GH07, S. 12 f., S. 197 f.] [Mil12, S. 15 f.]. Die Probenkonzentration ist in diesem Zusammenhang nach [Mil12, S. 16] in guter Näherung linear zum Absorptionskoeffizienten α . Der Wert d bezeichnet die Probendicke, e die Euler’sche Zahl.

Bei [GH07, S. 198] wird als Obergrenze für die Linearität zwischen der Absorbanz und der Konzentration beispielhaft ein Wert von $A_{max} = 0,7$ für die praktische Anwendung genannt. Die Verwendung des Absorptionskoeffizienten α zur Berechnung der Absorbanz ist gültig für den Fall, dass absorptionsunabhängige Einflüsse wie z.B. Streuung vernachlässigt werden können [Rot12, S. 6]. Dies ist bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Fall (s. Abschnitt 4.1.2).

$$A(\nu) = \alpha(\nu) \cdot d \cdot \log_{10}(e) \quad \text{ohne Einheit} \quad (2.6)$$

Absorbanzspektren, vor allem solche von Flüssigkeiten und Festkörpern, erscheinen nicht als scharfe Linien bei einer bestimmten Frequenz ν_A , sondern als mehr oder weniger breite Banden, wie in Abbildung 2.3 beispielhaft dargestellt [Ban83, S. 22]. Abhängig von Parametern wie beispielsweise dem Druck, können die Formen solcher Banden durch Gauß- und Lorentz-Profile

beschrieben werden [GH07, S. 10 ff., S. 233] [Ber95, S. 31] [PWB⁺09].

Ein beispielhafter Grund für die Verbreiterung von Spektrallinien sind Molekülkollisionen, die zu Moleküldeformationen und somit zur Veränderung der Energiezustände bzw. Schwingungsfrequenzen führen [Dem11, S. 51 ff.] [Ban83, S. 22 ff.] [GH07, S. 10 ff.]. Bei Proben, in denen eine Vielzahl verschiedener Moleküle enthalten sind, können sich Banden zudem überlappen. Dies geschieht z.B. teilweise im erwähnten Fingerprintbereich aufgrund der dort vorhandenen hohen spektralen Informationsdichte. Auch die spektrale Auflösung des Messgeräts hat Einfluss auf Gestalt und Bandenformen des Spektrums. Vergleichsweise fein getrennte Spektrallinien können mit entsprechend niedrigerer Auflösung nicht getrennt dargestellt werden und erscheinen in Folge als breitere Banden [Ban83, S. 100 f.].

2.2 Strahlungsquellen

2.2.1 Quantenkaskadenlaser (QCL)

Klassische Halbleiterlaser wie Laserdioden basieren auf der strahlenden Rekombination von Elektronen aus dem Leitungsband mit Löchern aus dem Valenzband [FCS⁺94]. Bei dieser Halbleiterlaserart sind daher zwei Ladungsträger, ein Elektron und ein Loch, für die Erzeugung eines Photons notwendig, weswegen sie als *bipolar* bezeichnet werden [ST08, S. 880].

Hingegen gelten Quantenkaskadenlaser (QCLs³) als *unipolare* Halbleiterlaser, da mit einem einzigen Ladungsträger, einem Elektron, mehrere Photonen erzeugt werden [ST08, S. 880] [FCS⁺94]. Realisiert wird dies durch Übergänge zwischen *Unterbändern* innerhalb des Leitungsbandes anstelle von Übergängen zwischen Leitungs- und Valenzband [SN07, S. 656].

Unterbänder entstehen in *Quantenschichtstrukturen* [ST08, S. 854]. Dies sind Heterostrukturen⁴, die aus ultradünnen⁵ Halbleiterschichten mit unterschiedlichen Bandlücken bestehen [ST08, S. 788]. Je nach Herstellungsweise bilden Quantenschichten entweder *Potentialtopf-* oder *Übergitterstrukturen* aus. Bei der Bildung von Potentialtöpfen sind die Energieniveaus deutlich getrennt (diskrete Energieniveaus), bei Übergitterstrukturen wechselwirken die Elektronen mit benachbarten Quantenschichten durch quantenmechanische Tunneleffekte. In letzterem Fall verbreitern sich die diskreten Energieniveaus zu sogenannten *Minibändern*, wobei die Anzahl der Zustände in einem Miniband der Anzahl der beteiligten Quantenschichten entspricht [ST08, S. 590f., S. 792, S. 881] [SN07, S. 58ff.].

Ein QCL besteht aus einer Abfolge *aktiver Regionen* und *Injektoren*, die beide als Quanten-

³Im Rahmen dieser Arbeit wird der Quantenkaskadenlaser mit QCL für englisch *quantum cascade laser* abgekürzt, der Plural mit QCLs.

⁴Strukturen, bestehend aus Schichten unterschiedlicher Halbleitermaterialien [Rei05, S. 292] [ST08, S. 786]

⁵Nach [ST08, S. 788] dünner als 50 nm, nach [ST08, S. 590 f.] teilweise bis unter 1 nm

schichten ausgeführt sind. Für Injektoren werden Übergitterstrukturen verwendet, für aktive Regionen je nach Bauweise Quantentopf- oder Übergitterstrukturen.

Der Photonenentstehungsprozess eines QCL ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt: Ein Elektron gelangt durch quantenmechanisches Tunneln von einem Injektor in eine aktive Region. Dort befindet es sich in einem Unterband des Leitungsbandes, von dem aus es strahlend auf ein Unterband mit niedrigerem Energieniveau übergeht, ohne das Leitungsband zu verlassen. Über eine weitere Injektorregion gelangt dasselbe Elektron in eine weitere aktive Region, wo es sich aufgrund des angelegten elektrischen Feldes wieder auf dem energetisch höheren Unterband befindet. Von dort aus geht das Elektron erneut strahlend auf ein niedrigeres Energieniveau über [ST08, S. 792, S. 880f.]. Nach [ST08, S. 882] enthält ein typischer QCL bis zu hundert solcher Stufen.

Eine Besetzungsinversion zur Verstärkung des Lichtfeldes wird aufgebaut, da das Tunneln in die aktive Region hinein ($\sim 0,2$ ps)⁶ sowie das Tunneln aus der aktiven Region heraus ($\sim 0,6$ ps) schneller ist als der strahlende Übergang zwischen den Unterbändern ($\sim 4,3$ ps) [FCS⁺94] [Gan03, S. 6]. Die Ladungsträgerkonzentration des unteren Energieniveaus ist daher immer niedriger als die des oberen [SN07, S. 657].

Durch die erwähnten Übergänge zwischen Unterbändern können Photonen emittiert werden, die niedrigere Energien aufweisen als Photonen, die bei Übergängen zwischen Leitungs- und Valenzband emittiert würden [Qui06, S. 212]. Dadurch ist es nach [ST08, S. 882 f.] in der Praxis möglich, QCLs für den Wellenlängenbereich von 2 bis teilweise 150 μm herzustellen.

QCLs mit hohen spektralen Bandbreiten zeigen spektrale Breiten von ca. 20 % bis 25 % ihrer zentralen Emissionswellenzahl [BT13, S. 599 f.]. Beispielsweise wird bei [HG11] eine Bandbreite von 250 cm^{-1} bei einer Emission im Bereich um 1150 cm^{-1} beschrieben.

Breitbandige QCLs verfügen über optische Leistungen von mehreren hundert Milliwatt und sind sowohl für gepulsten als auch für kontinuierlichen Betrieb erhältlich [Day13b].

2.2.2 Sonstige Strahlungsquellen

Weitere Strahlungsquellen im mittleren Infrarotbereich (MIR) sind beispielsweise Temperaturstrahler, Synchrotronstrahlung, CO₂-Laser, Bleisalzdiodenlaser und die Erzeugung kohärenter Strahlung im MIR durch Frequenzmischung anderer Wellenlängenbereiche in optisch nichtlinearen Medien [Lee09, S. 7 ff.] [NWM⁺11] [SV03] [Gan03, S. 18 ff.] [Cha05, S. 9]. Letzteres geschieht z.B. durch optisch parametrische Oszillatoren (OPOs) oder Differenzfrequenzerzeugung (DFG) [ST08, 1055–1106] [SV03] [Dem11, S. 218 f.].

⁶Die in Klammern angegebenen Zeitwerte beziehen sich auf den ersten experimentell nachgewiesenen QCL von Faist et al. [FCS⁺94].

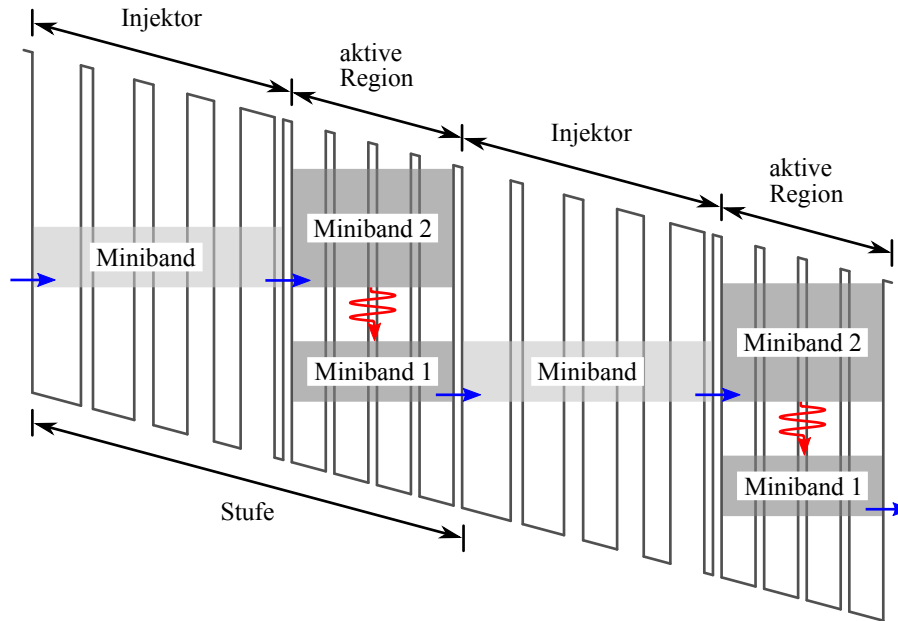


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung zweier Stufen eines QCL mit einem Übergitter als aktiver Region. In Anlehnung an [ST08, S. 881].

Temperaturstrahler werden als Strahlungsquellen (sog. *Globars*) für die in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen FTIR-Spektrometer im mittleren Infrarotbereich (MIR) verwendet [GH07, S. 143, S. 161 ff.]. Im thermischen Gleichgewicht wird Strahlung emittiert, deren Leistung durch die Planck'sche Strahlungsgleichung⁷ beschrieben wird und deren Gesamtleistung von der Strahlertemperatur abhängt [HMS04, S. 214, S. 440 f.] [ST08, S. 618]. Vorteile von Globars sind zum einen das im Vergleich zu MIR-Lasern breite Emissionsspektrum, zum anderen geringere Kosten aufgrund der einfachen Bauweise.

Synchrotronstrahlung wird von relativistischen Elektronen bei der Ablenkung im Magnetfeld ausgesandt [Sch13, S. 170]. Diese breitbandige Strahlungsart weist nach [KS06, JM97, KIBH⁺09] eine 100 bis 1000-fach höhere Brillanz⁸ auf als ein Temperaturstrahler und wird für FTIR-Mikrospektroskopie verwendet [MKP05, NWM⁺11, Abu11]. Aufgrund des benötigten Teilchenbeschleunigers ist diese Strahlung jedoch aufwändig zu generieren und vergleichsweise teuer [WN05].

CO₂-Laser können nach [Lee09, S. 7] nur bei diskreten Wellenlängen zwischen ca. 9,2 µm und 11,5 µm emittieren und somit nicht breit durchgestimmt werden.

Bleisalzdiodenlaser sind breiter durchstimmbare Halbleiterlaser (Durchstimmbarkeit von ca. 100 cm⁻¹ nach [SV03, S. 450]), verfügen aber über eine im Vergleich mit Quantenkaskadenlasern geringe Ausgangsleistung (< 1 mW nach [SV03, S. 450]). Zudem ist die Kühlung nach [Gan03, S. 4, S. 18] [SV03, S. 450] vergleichsweise aufwändig.

⁷Beispielsweise zu finden bei [Dem11, S. 9]

⁸Leistung pro Raumwinkel und Emissionsfläche [Qui06, S. 216, S. 288]

Nach [Lee09, S. 9] [Cha05, S. 9 ff.] [SV03, S. 461] [Gan03, S. 4] bestehen bei OPOs und DFG in Bezug auf spektroskopische Anwendungen Herausforderungen bezüglich der Pump Laser, zudem sind sie im Vergleich zu Quantenkaskadenlasern relativ voluminös.

2.3 Spektrometerprinzipien

2.3.1 Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR-Spektrometer)

In einem Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR-Spektrometer) wird breitbandige Strahlung eines Temperaturstrahlers oder einer Synchrotronquelle durch ein Interferometer moduliert und von einem Detektor gemessen [DAJ01, S. 36 f.] [GH07]. Die Wechselwirkung der Strahlung mit der Probe findet dabei in der praktischen Anwendung i. d. R. nach dem Interferometer statt [WN05]. Nach [WN05] ist das gängigste verwendete Interferometer ein klassisches Zweistrahl-Michelson-Interferometer, welches in Abbildung 2.5a skizziert ist. Die Strahlung wird durch einen halbdurchlässigen Spiegel aufgeteilt, wobei ein Teil der Strahlung auf einen unbeweglichen, der andere Teil auf einen beweglichen Spiegel trifft. Durch die Bewegung des zweiten Spiegels wird die Strahlung aufgrund der Kohärenz der beiden Strahlhälften moduliert und es entsteht ein Interferogramm nach Abbildung 2.5b [DAJ01, S. 36 f.] [GH07, S. 19 ff.] [Rei05, S. 129 ff.]. Mittels Fourier-Transformation wird aus dem Interferogramm, das für jede Spiegelstellung Informationen über jede der emittierten Wellenlängen enthält [GH07, S. 171], ein Einkanalspektrum nach Abbildung 2.5c berechnet. Aufgrund der verwendeten breitbandigen Lichtquellen kann der gesamte mittlere Infrarotbereich durch ein einziges Spektrometer abgedeckt werden.

2.3.2 Dispersive Spektrometer

In klassischen dispersiven Spektrometern wird die Strahlung einer breitbandigen Lichtquelle mithilfe eines dispersiven Elements wie einem Prisma oder einem diffraktiven⁹ Element wie einem Beugungsgitter räumlich aufgespalten. Dadurch können die getrennten Spektralbereiche sequentiell gemessen werden [HMS04, S. 459 f.] [Dem11, S. 70].

⁹An dieser Stelle werden zur Vereinfachung Spektrometer, die auf diffraktiven Elementen beruhen, ebenfalls unter disperse Spektrometer gezählt. Dies entspricht der Vorgehensweise z.B. bei [Dem11, S. 70] oder [LF14].

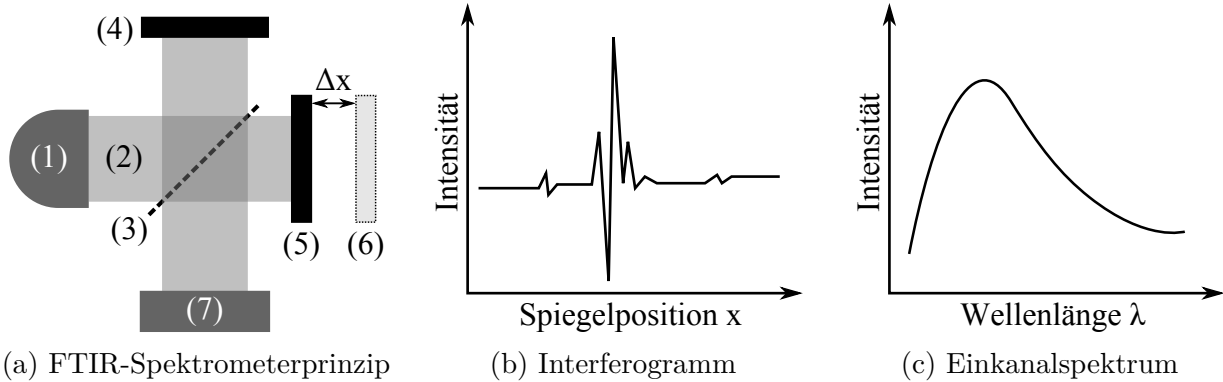


Abbildung 2.5: (a) Prinzipieller Aufbau eines FTIR-Spektrometers mit breitbandiger Lichtquelle (1), breitbandiger Strahlung (2), Strahlteiler (3), unbeweglichem Spiegel (4), beweglichem Spiegel in Position x_1 (5) bzw. x_2 (6) und Detektor (7). (b) Beispielhaftes Interferogramm, das durch Spiegelbewegung (5) bzw. (6) entlang x entsteht. (c) Beispielhaftes aus einem Interferogramm mittels Fourier-Transformation berechnetes Einkanalspektrum.

Nach [WN05] und [GH07] wurden diese klassischen dispersiven Spektrometer für Anwendungen im MIR jedoch im Prinzip vollständig von den im letzten Abschnitt 2.3.1 beschriebenen FTIR-Spektrometern verdrängt. Gründe dafür sind z.B. der *Multiplex*-Vorteil nach Fellgett oder der *Durchsatz*-Vorteil nach Jacquinot. Der Multiplex-Vorteil beschreibt für die gleiche spektrale Auflösung und Messdauer eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses um die Wurzel der aufgelösten Spektralelemente bei FTIR-Spektrometern. Grund dafür ist, dass durch die Verwendung des Interferometers anstelle eines dispersiven Elements zu jedem Zeitpunkt Informationen aller Wellenlängen gemessen werden und sich das Rauschen somit auf alle gemessenen Frequenzen verteilt [GH07, S. 171 f.] [Hir79, S. 197]. Der Durchsatz-Vorteil hingegen beschreibt eine höhere Lichtausbeute durch den Wegfall von Spaltoptiken wie sie bei klassischen dispersiven Spektrometern notwendig sind [GH07, S. 172] [Hir79, S. 199].

Durch das Aufkommen der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Quantenkaskadenlaser gewinnen dispersive Spektrometer im mittleren Infrarotbereich jedoch wieder an Bedeutung: Zur Durchstimbarkeit breitbandiger QCLs werden externe Resonatoren verwendet, wie beispielhaft in Abbildung 2.6 gezeigt [BT13, S. 596 ff.] [CCG⁺10] [LTO⁺96] [WCR⁺10]. Mithilfe eines Beugungsgitters als wellenlängenselektierendem Element kann das Verstärkungsprofil eines breitbandigen (z.B. 200 cm^{-1})¹⁰ QCL auf ein schmales Intervall (z.B. 1 cm^{-1} Halbwertsbreite) eingengt werden [Dem11, S. 218] [WCR⁺10, Day12]. Je nach Gitterstellung können dabei unterschiedliche solcher Intervalle des Laserspektrums sequentiell emittiert und detektiert werden [MBF04]. Im Vergleich zu ursprünglichen dispersiven oder FTIR-Spektrometern zeigen

¹⁰Beispielhafte Werte für einen bei [Day12] beschriebenen QCL, emittierend im Bereich von 1115 cm^{-1} bis 1315 cm^{-1}

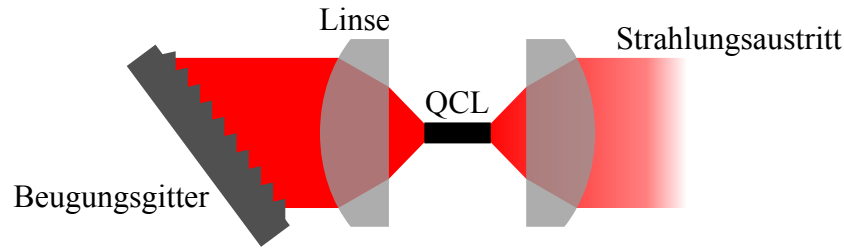


Abbildung 2.6: Externer Resonator in Littrow-Konfiguration zum Durchstimmen eines breitbandigen Quantenkaskadenlasers. In Anlehnung an [WCR⁺10].

QCL-basierte Systeme aufgrund der Lasereigenschaften eine deutliche höhere spektrale Leistungsdichte. Die genannten Vorteile eines FTIR-Spektrometers (Fellgett, Jacquinot) verlieren dadurch an Bedeutung.

Aktuelle QCL-basierte Systeme mit bis zu vier enthaltenen Laserkavitäten weisen Bandbreiten von über 1000 cm^{-1} auf, z.B. zwischen ca. 1900 cm^{-1} und 800 cm^{-1} [YKLB15].

2.4 Messmethoden

2.4.1 Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)

Physikalische Grundlagen

Ebene Wellen an Übergängen zwischen verschiedenen Medien

Gleichung (2.7) beschreibt das elektrische Feld \mathbf{E} einer ebenen elektromagnetischen Welle in einem Medium mit Brechungsindex n [Dem13, S. 194] [Mil12, S. 13]. Die Variable \mathbf{x} bezeichnet dabei den Ortsvektor, t die Zeit, \mathbf{E}_0 den Vektor der Feldstärkenamplitude, i die imaginäre Einheit entsprechend $i^2 = -1$, \mathbf{k}_n den Wellenvektor und $\omega = 2\pi\nu$ die Kreisfrequenz mit ν als Frequenz [Ban83, S. 2] [Dem13, S. 194] [BSMM06, S. 5, S. 34]. Entsprechende Variablen werden in diesem Kapitel mit einem Index n versehen, wenn es sich um die Größe in einem Medium mit Brechungsindex n handelt. Variablen ohne diesen Index bezeichnen die entsprechende Größe im Vakuum.

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_0 e^{i\mathbf{k}_n \mathbf{x} - i\omega t} \quad \text{in V m}^{-1} \quad (2.7)$$

Bewegt sich die durch Gleichung (2.7) beschriebene Welle in einem Medium mit Brechungsindex n_1 und trifft, wie in Abbildung 2.7a gezeigt, auf ein Medium mit Brechungsindex $n_2 < n_1$, wird die einfallende Welle für Einfallswinkel $\Theta_1 < \Theta_{1C}$ in einen reflektierten und einen transmittierten (gebrochenen) Anteil aufgespalten. Winkel Θ_{1C} ergibt sich aus Gleichung (2.10) als Folge des Snellius'schen Brechungsgesetzes nach Gleichung (2.8) bzw. (2.9) [Mil12, S. 42, S. 50]. Für

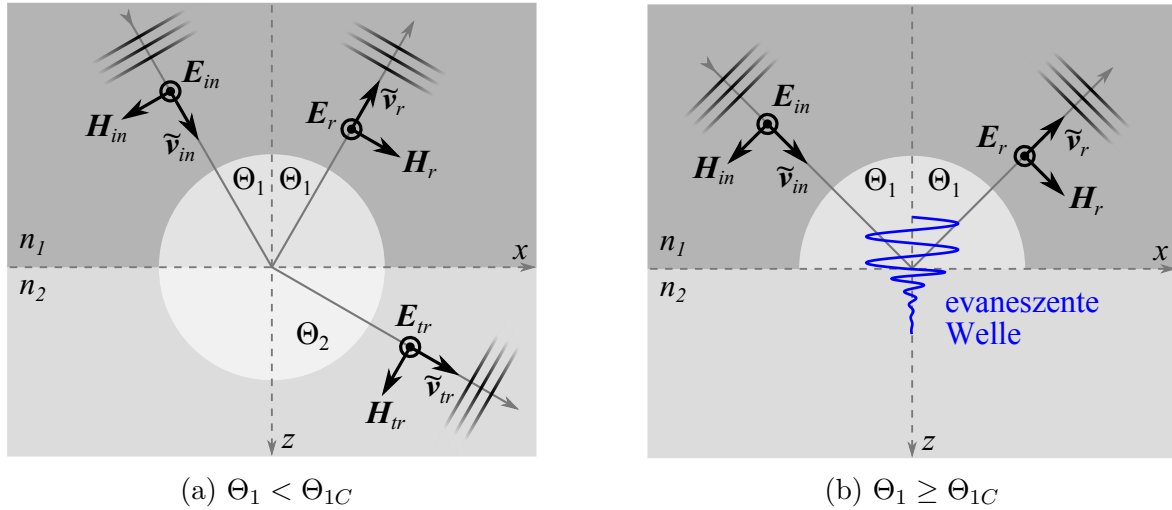


Abbildung 2.7: Übergang ebener Wellen an der Grenzfläche zweier Medien mit den Brechungsindizes $n_2 < n_1$ für den Fall senkrechter Polarisation. \mathbf{E} beschreibt das jeweilige elektrische Feld, \mathbf{H} das jeweilige magnetische Feld, $\tilde{\nu}$ den jeweiligen Wellenzahlvektor. (a) Reflexion und Transmission; in Anlehnung an [Rei05, S. 33]. (b) Entstehung einer evaneszenten Welle bei Totalreflexion; in Anlehnung an [Rei05, S. 33] und [KC10].

Winkel $\Theta_1 \geq \Theta_{1C}$ kommt es zu Totalreflexion [Dem13, S. 237 f.], auf die in diesem Abschnitt an späterer Stelle eingegangen wird.

$$n_1 \sin \Theta_1 = n_2 \sin \Theta_2 \quad (2.8)$$

$$\Rightarrow \Theta_1 = \arcsin \left[\frac{n_2}{n_1} \sin \Theta_2 \right] \quad (2.9)$$

$$\Theta_{1C} = \arcsin \left[\frac{n_2}{n_1} \sin (\Theta_2 = 90^\circ) \right] = \arcsin \left[\frac{n_2}{n_1} \right] \quad (2.10)$$

Der Wellenvektor \mathbf{k}_n aus Gleichung (2.7) zeigt senkrecht zu den Phasenflächen der ebenen Welle in Ausbreitungsrichtung [Dem13, S. 194] [Rei05, S. 7] und kann nach Gleichung (2.11) in Abhängigkeit des Wellenzahlvektors¹¹ $\tilde{\nu}$ (s. Gleichung (2.1) in Abschnitt 2.1.1) beschrieben werden [Mil12, S. 13].

$$\mathbf{k}_n = 2\pi n \tilde{\nu} \quad \text{in m}^{-1} \quad (2.11)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (2.11) in Gleichung (2.7) ergeben sich die elektrischen Felder \mathbf{E}_{in} , \mathbf{E}_r und \mathbf{E}_{tr} der einfallenden, reflektierten und transmittierten Welle entsprechend der

¹¹Bei [Dem11, S. 20] [Dem13, S. 194, S. 227] [Rei05, S. 6] [Jac02, S. 342] [ST08, S. 49] wird der Betrag des Wellenvektors $|\mathbf{k}_n| = 2\pi/\lambda_n$ als Wellenzahl bezeichnet, mit λ_n als Wellenlänge. Als Widerspruch dazu wird bei [Dem11, S. 117] [GH07, S. 4] [Mil12, S. 13] [Ber95, S. 4] [Ban83, S. 4] mit dem Begriff *Wellenzahl* (englisch *wavenumber*) die Größe $\tilde{\nu}_n = 1/\lambda_n$ bezeichnet. Entsprechend letzterer Auslegung beschreibt der Begriff *Wellenzahl* in der vorliegenden Arbeit den Kehrwert der Wellenlänge nach Gleichung (2.1) in Abschnitt 2.1.1.

Gleichungen (2.12), (2.13) und (2.14).

$$\mathbf{E}_{in}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{0in} e^{2\pi i n_1 \tilde{\nu}_{in} \mathbf{x} - i\omega t} \quad \text{in V m}^{-1} \quad (2.12)$$

$$\mathbf{E}_r(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{0r} e^{2\pi i n_1 \tilde{\nu}_r \mathbf{x} - i\omega t} \quad \text{in V m}^{-1} \quad (2.13)$$

$$\mathbf{E}_{tr}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{0tr} e^{2\pi i n_2 \tilde{\nu}_{tr} \mathbf{x} - i\omega t} \quad \text{in V m}^{-1} \quad (2.14)$$

Der ortsabhängige Teil des Exponenten aus Gleichung (2.14) kann für den zweidimensionalen Fall nach Gleichung (2.15) unter Verwendung des Skalarprodukts in Abhängigkeit des Brechungswinkels Θ_2 ausgedrückt werden (vgl. Abbildung 2.7a) [Mil12, S. 55]:

$$2\pi i n_2 \tilde{\nu}_{tr} \mathbf{x} = 2\pi i n_2 (\tilde{\nu}_x x + \tilde{\nu}_z z) = 2\pi i n_2 \tilde{\nu} (x \sin \Theta_2 + z \cos \Theta_2) \quad (2.15)$$

In einem weiteren Schritt ist es möglich, diesen Term unter Verwendung der trigonometrischen Umformung $\sin^2 \alpha + \cos^2 \alpha = 1$ sowie des Brechungsgesetzes nach Gleichung (2.8) in Abhängigkeit des Einfallswinkels Θ_1 wie folgt zu beschreiben [Mil12, S. 55, S. 99]:

$$\begin{aligned} 2\pi i n_2 \tilde{\nu} (x \sin \Theta_2 + z \cos \Theta_2) &= \\ &= 2\pi i \tilde{\nu} \left(x n_2 \sin \Theta_2 + z \sqrt{n_2^2 - n_2^2 \sin^2 \Theta_2} \right) = \\ &= 2\pi i \tilde{\nu} \left(x n_1 \sin \Theta_1 + z \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1} \right) \end{aligned} \quad (2.16)$$

Das elektrische Feld der gebrochenen Welle aus Gleichung (2.14) kann daher unter Verwendung von Gleichung (2.16) folgendermaßen dargestellt werden:

$$\mathbf{E}_{tr}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{0tr} e^{-i\omega t} e^{2\pi i n_1 \tilde{\nu} x \sin \Theta_1} e^{2\pi i \tilde{\nu} z \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}} \quad (2.17)$$

Totalreflexion

Das elektrische Gesamtfeld $\mathbf{E}_{n_1}^{ges}$ im Medium mit Brechungsindex n_1 , d.h. das Feld im einfallsseitigen Halbraum, ergibt sich aus der Überlagerung von einfallendem und reflektiertem Feld nach Gleichung (2.18)¹². Mit k_{in}^x bzw. k_{in}^z werden die Komponenten des in Gleichung (2.7) verwendeten Wellenvektors der einfallenden Welle in x - bzw. z -Richtung bezeichnet. Die Komponenten der reflektierten Welle wurden durch Komponenten der einfallenden Welle unter Verwendung von $k_r^z = -k_{in}^z$ und $k_r^x = k_{in}^x$ ersetzt (vgl. Abbildung 2.7a und Gleichung (2.11)) [Rei05, S. 28, S. 36, S. 42].

Gleichung (2.18) zeigt, dass das Gesamtfeld aus einer stehenden Welle senkrecht zur Grenzfläche (z -Richtung, s. Abbildung 2.7a) und einer laufenden Welle parallel zur Grenzfläche (x -Richtung) besteht [Rei05, S. 42] [Har67, S. 25 ff.]. Mit ψ wird die einfallswinkel-, polarisations- und bre-

¹²Eine Herleitung findet sich z.B. bei [Rei05, S. 42].

chungsindexabhängige Phasenverschiebung der stehenden Welle bezeichnet [Rei05, S. 41 f.].

$$\mathbf{E}_{n_1}^{ges}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{in} + \mathbf{E}_r = \dots = \mathbf{E}_{0n_1}^{ges} \overbrace{\cos(k_{in}^z z + \psi)}^{\text{stehende Welle}} \overbrace{e^{i(k_{in}^x x - \omega t)}}^{\text{laufende Welle}} \quad (2.18)$$

Wie Abbildung 2.7b zeigt, wird für Einfallswinkel $\Theta_1 \geq \Theta_{1C}$ nach Gleichung (2.10) die einfallende Strahlung totalreflektiert. Aufgrund von Stetigkeitsbedingungen endet das durch Gleichung (2.18) beschriebene elektrische Feld jedoch nicht abrupt an der Grenzfläche, sondern klingt als evaneszente Welle in z -Richtung exponentiell ab [Rei05, S. 3, S. 32, S. 167] [Har67, S. 28 f.] [Dem13, S. 232] [Mil12, S. 42 ff., S. 55] [Yeh05, S. 58].

Der Übergang der gebrochenen zu einer evaneszenten Welle im Falle von Totalreflexion lässt sich anhand der Gleichungen (2.19) und (2.20) zeigen: Der linke Term in Gleichung (2.19) entspricht dem z -abhängigen Exponenten aus Gleichung (2.17). Der Term unter der Wurzel ist für Winkel $\Theta_1 \geq \Theta_{1C}$, d.h. bei Totalreflexion, negativ, da in diesem Fall $n_2^2 < n_1^2 \sin^2 \Theta_1$ gilt. Unter Verwendung von $i^2 = -1$ ergibt sich der rechte, nichtkomplexe Term in Gleichung (2.19) und daraus folgend Gleichung (2.20) für den Fall von Totalreflexion. Das elektrische Feld im Medium mit Brechungsindex n_2 bewegt sich somit analog zum Feld im einfallsseitigen Halbraum (Gleichung (2.18)) parallel zur Grenzfläche in x -Richtung, fällt jedoch in z -Richtung exponentiell ab [Mil12, S. 56].

$$2\pi i \tilde{\nu} z \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1} = 2\pi i \tilde{\nu} z \sqrt{i^2(n_1^2 \sin^2 \Theta_1 - n_2^2)} = -2\pi \tilde{\nu} z \sqrt{n_1^2 \sin^2 \Theta_1 - n_2^2} \quad (2.19)$$

$$\mathbf{E}_{tr}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{otr} e^{-i\omega t} e^{2\pi i n_1 \tilde{\nu} x \sin \Theta_1} e^{-2\pi \tilde{\nu} z \sqrt{n_1^2 \sin^2 \Theta_1 - n_2^2}} \quad (2.20)$$

Der Wert d_p nach Gleichung (2.21) wird als Eindringtiefe der evaneszenten Welle bezeichnet. Er entspricht dem Abstand von der Grenzfläche, bei dem die Welle auf $1/e$ ihres Maximalwerts abgeklungen ist [Har67, S. 30 f.] [Mil12, S. 56 f.]. In der praktischen Anwendung liegt die Eindringtiefe in der Größenordnung der Wellenlänge, bei Anwendungen im mittleren Infrarotbereich somit i. d. R. bei wenigen Mikrometern [KC10, SK13, WN05].

$$d_p = \frac{1}{2\pi \tilde{\nu} \sqrt{n_1^2 \sin^2 \Theta_1 - n_2^2}} \quad (2.21)$$

Komplexer Brechungsindex

Die Absorption eines Mediums kann durch einen komplexen Brechungsindex nach Gleichung (2.22) beschrieben werden. Der Realteil \tilde{n} beschreibt die Dispersion, der Imaginärteil κ , auch *Absorptionsindex* genannt, die Absorption [Dem13, S. 224 f.] [Mil12, S. 14 f.] [GH07, S. 14 f.] [Yeh05, S. 38 ff.]. Gleichung (2.23) zeigt den Zusammenhang zwischen dem Absorptionsindex κ und dem in Gleichung (2.6) verwendeten Absorptionskoeffizienten α [Dem13,

S. 223] [GH07, S. 15].

$$n(\tilde{\nu}) = \tilde{n}(\tilde{\nu}) + i \cdot \kappa(\tilde{\nu}) \quad \text{ohne Einheit} \quad (2.22)$$

$$\kappa = \frac{\alpha}{4\pi\tilde{\nu}} \quad \text{ohne Einheit} \quad (2.23)$$

Mithilfe des komplexen Brechungsindex kann nun das elektrische Feld nach Gleichung (2.24) für ein absorbierendes Medium mit komplexem Brechungsindex n_2 beschrieben werden, indem Gleichung (2.22) unter Verwendung des entsprechenden Variablenindex die Variable n_2 in Gleichung (2.20) ersetzt [Mil12, S. 59]. An dieser Stelle wird vereinfachend angenommen, dass das einfallsseitige Medium mit Brechungsindex n_1 nicht absorbierend und n_1 somit real ist. Diese Vereinfachung ist in diesem Zusammenhang zulässig, da für die Anwendung der im Folgenden beschriebenen abgeschwächten Totalreflexion vergleichsweise gering absorbierende Materialien als einfallsseitige Medien verwendet werden [Mil12, S. 59].

$$\mathbf{E}_{tr}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{0tr} e^{-i\omega t} e^{2\pi i n_1 \tilde{\nu} x \sin \Theta_1} e^{-2\pi \tilde{\nu} z \sqrt{n_1^2 \sin^2 \Theta_1 - \tilde{n}_2^2 + \kappa_2^2 - 2i\tilde{n}_2 \kappa_2}} \quad (2.24)$$

Der z -abhängige Exponent ist nun ebenfalls komplex. Somit zeigt Gleichung (2.24) für $\kappa_2 > 0$ eine Ausbreitung der Strahlungsenergie nicht nur in x -, sondern auch in z -Richtung. Die Energie der reflektierten Strahlung entspricht daher trotz Totalreflexion nicht der Energie der einfallenden Strahlung, da die Totalreflexion von einer Ausbreitung in das dünnere Medium begleitet wird und somit Absorption stattfindet [Mil12, S. 60]. Dies wird *abgeschwächte Totalreflexion* (ATR) genannt.

Quantifizierung der absorbierten Strahlungsenergie

Basierend auf Randbedingungen an der Grenzfläche [Rei05, S. 32] zwischen den in Abbildung 2.7 gezeigten zwei Medien werden die in den Gleichungen (2.25) und (2.26) beschriebenen Reflexionskoeffizienten r_{12}^σ bzw. r_{12}^π nach Fresnel berechnet [Rei05, S. 32–36] [Mil12, S. 43 f., S. 46, S. 68 ff.]. Die Indizes σ bzw. π bezeichnen dabei die Fälle senkrecht bzw. parallel zur xz -Ebene polarisierter Strahlung (vgl. Abbildung 2.7).

Aus den quadrierten Beträgen der Reflexionskoeffizienten ergeben sich nach den Gleichungen (2.25) und (2.26) die Reflektivitäten R_{12}^σ bzw. R_{12}^π [Rei05, S. 32 ff.] [Dem13, S. 231 ff.]. Die Reflektivität R beschreibt dabei den Anteil der reflektierten Strahlungsenergie.

Der Winkel Θ_2 , der nach Abbildung 2.7b im Falle von Totalreflexion nicht vorhanden ist, kann durch den bereits in Gleichung (2.16) verwendeten Zusammenhang $n_2 \cos \Theta_2 = \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}$ ersetzt werden. Diese Umformung wurde in den Gleichungen (2.25) und (2.26) verwendet. Durch die so dargestellte Reflektivität ist es möglich, die reflektierte Strahlungsleistung auch bei abgeschwächter Totalreflexion zu berechnen, obwohl der Ausfallswinkel

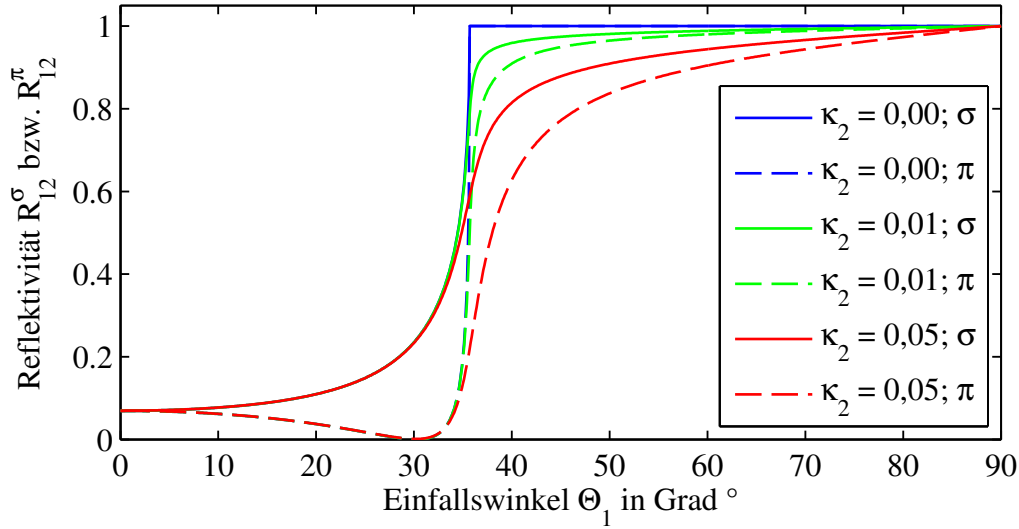


Abbildung 2.8: Einfallswinkelabhängige Reflektivität für senkrecht (σ) bzw. parallel (π) polarisierte Strahlung. Verwendete Parameter der komplexen Brechungsindizes sind $\tilde{n}_1 = 2, 4$; $\kappa_1 = 0$; $\tilde{n}_2 = 1, 4$; κ_2 siehe Legende. Für $\kappa_2 = 0$, d.h. im Falle eines realen Brechungsindex, wird die Strahlung für Winkel $\Theta_1 \geq \arcsin(n_2/n_1) \approx 35,7^\circ$ vollständig reflektiert, für $\kappa > 0$ wird ein Teil der Strahlung absorbiert. R_{12}^π ist Null an der Stelle des Brewsterwinkels bei $\Theta_{1B} = \arctan(n_2/n_1) \approx 30,3^\circ$ [Rei05, S. 39].

Θ_2 in diesem Fall nicht existiert.

$$R_{12}^\sigma = |r_{12}^\sigma|^2 = \left| \frac{E_r^\sigma}{E_{in}^\sigma} \right|^2 = \left| \frac{n_1 \cos \Theta_1 - n_2 \cos \Theta_2}{n_1 \cos \Theta_1 + n_2 \cos \Theta_2} \right|^2 = \left| \frac{n_1 \cos \Theta_1 - \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}}{n_1 \cos \Theta_1 + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}} \right|^2 \quad (2.25)$$

$$R_{12}^\pi = |r_{12}^\pi|^2 = \left| \frac{E_r^\pi}{E_{in}^\pi} \right|^2 = \left| \frac{n_2 \cos \Theta_1 - n_1 \cos \Theta_2}{n_2 \cos \Theta_1 + n_1 \cos \Theta_2} \right|^2 = \left| \frac{n_2 \cos \Theta_1 - \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}}{n_2 \cos \Theta_1 + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}} \right|^2 \quad (2.26)$$

Abbildung 2.8 zeigt beispielhaft die polarisationsabhängige Reflektivität für verschiedene Werte von κ_2 unter Verwendung der Gleichungen (2.22), (2.25) und (2.26). Im Falle von Totalreflexion wird einfallende Strahlung entweder reflektiert oder absorbiert, da aufgrund der Totalreflexion keine Transmission stattfindet¹³. Aus der Reflektivität R ergibt sich daher für Winkel $\Theta_1 \geq \Theta_{1C}$ der absorbierte Strahlungsanteil zu $1 - R$ [Har67, S. 21]. Abbildung 2.8 zeigt somit, dass für $\Theta_1 \geq \Theta_{1C}$ die einfallende Strahlung für $\kappa_2 = 0$ vollständig reflektiert, für $\kappa_2 > 0$ jedoch ein Teil der Strahlung absorbiert wird.

¹³Wird ein Medium mit ausreichend großem Brechungsindex in den Bereich der evaneszenten Welle gebracht, wird unter bestimmten Bedingungen trotz Totalreflexion ein Teil der Strahlung durch Tunneleffekte transmittiert [Har67, S. 32, S. 36] [Rei05, S. 43]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist dieser Effekt aber nicht von Bedeutung, weswegen nicht näher darauf eingegangen wird.

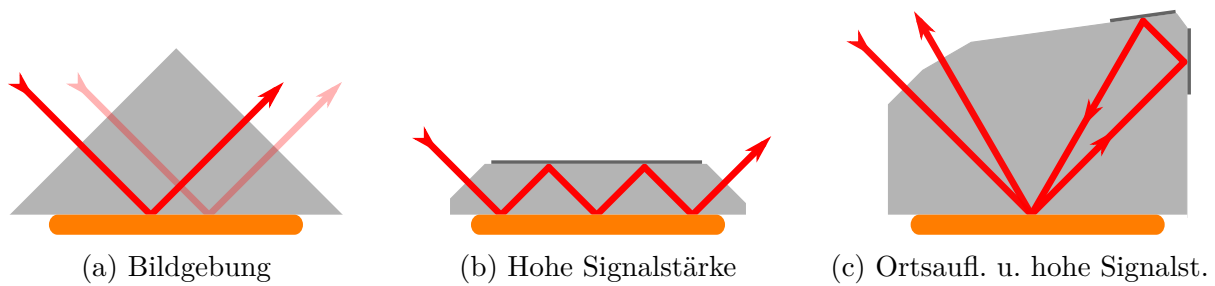


Abbildung 2.9: Verschiedene Kristallgeometrien (grau) zur Totalreflexion von Strahlung (rot) für die Messung von Proben (orange) mittels abgeschwächter Totalreflexion. Die in (a) gezeigte Geometrie ermöglicht Bildgebung, z.B. durch den angedeuteten Scanvorgang. Die in (b) gezeigte Geometrie ermöglicht eine hohe Signalstärke aufgrund der Mehrfachreflexion, liefert jedoch keine Ortsauflösung. Die in (c) gezeigte Geometrie ermöglicht eine hohe Signalstärke aufgrund der Mehrfachreflexion und liefert Ortsauflösung; Bildgebung wie bei (a) gezeigt ist mit dieser Geometrie allerdings nicht möglich. Diese und Variationen der Kristallgeometrien sind z.B. beschrieben bei [Har67, S. 94–126]

Kristallgeometrien und -materialien

Kristallgeometrien

Kristallgeometrien lassen sich in Mehrfach- und Einfachreflexionskristalle einteilen. Abbildung 2.9a zeigt als Beispiel für einen Einfachreflexionskristall ein Prisma, Abbildung 2.9b beispielhaft einen Mehrfachreflexionskristall. Einfachreflexionskristalle werden i. d. R. verwendet, wenn Ortsinformation relevant ist, z.B. bei spektraler Bildgebung [LB05]. Der Vorteil von Mehrfachreflexionskristallen hingegen ist die höhere Signalstärke, die sich aus der durch Mehrfachreflexion bedingten stärkeren Absorption ergibt [Har67, S. 89] [GH07, S. 336]. Eine weitere Geometrie ist in Abbildung 2.9c gezeigt. In diesem Kristall reflektiert Strahlung mehrfach am gleichen Ort. Dadurch bleibt die Ortsinformation erhalten und es ergibt sich eine höhere Signalstärke aufgrund der Mehrfachreflexion. Diese Kristallgeometrie ermöglicht jedoch im Gegensatz zu dem Prisma Bildgebung nur durch Versetzen des Kristalls relativ zur Probe und ist daher zur Untersuchung bestimmter Proben, z.B. frischem Gewebe, in der Praxis ungeeignet.

Kristallmaterialien

Für ATR im mittleren Infrarotbereich verwendete Kristallmaterialien sind vornehmlich Diamant, Zinkselenid (ZnSe) und Germanium (Ge) [GH07, S. 323 f.]. Diese Materialien sind im MIR ausreichend transparent und haben einen zur Generierung von Totalreflexion notwendigen hohen Brechungsindex ($n = 2,4$ für Diamant und ZnSe; $n = 4$ für Ge) [GH07, S. 252, S. 323]. Verglichen mit den anderen beiden Materialien ist Diamant teurer, dafür jedoch vergleichsweise

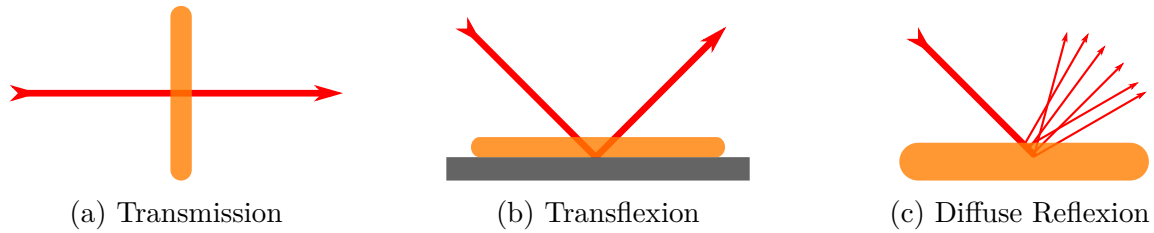


Abbildung 2.10: Verschiedene Messmethoden, die neben abgeschwächter Totalreflexion zur spektralen Gewebemessung im mittleren Infrarotbereich verwendet werden.

robust [GH07, S. 252 f., S. 337]. Germanium ermöglicht aufgrund des hohen Brechungsindex eine niedrigere Eindringtiefe d_p , was bei bestimmten Anwendungen gewünscht ist [GH07, S. 327]. ZnSe ist für viele Anwendungen gut geeignet aufgrund der im Vergleich zu Diamant geringen Kosten und im Vergleich zu Ge höheren Eindringtiefe [GH07, S. 327].

2.4.2 Transmission, Diffuse Reflexion und Transflexion

Neben ATR werden zur Gewebemessung im mittleren Infrarotbereich *Transmission*, *Transflexion* und *diffuse Reflexion* (DR) verwendet [BWZM02]. Diese drei Messmethoden sind in Abbildung 2.10 skizziert. Bei Transmission durchdringt die Strahlung das Gewebe einmalig [BWZM02, LHL⁺02]. Bei Transflexion hingegen wird das Gewebe zweimal durchdrungen, da die Strahlung durch einen Spiegel an der Geweberückseite reflektiert wird [GH07, S. 297]. Diffuse Reflexion beschreibt die durch Reflexion, Brechung und Beugung rückgestreuten Photonen bei Beleuchtung einer entsprechend diffus reflektierenden Probe, wie z.B. Gewebe [GH07, S. 349] [BWZM02].

Ein Vorteil von ATR gegenüber diesen Verfahren ist, dass die Probenpräparation vergleichsweise einfach ist, da die Eindringtiefe bei ATR unabhängig von der Probendicke ist. Daher können beispielsweise stark absorbierende wässrige Proben gemessen werden, ohne dass die Strahlung vollständig absorbiert wird [KIBH⁺09]. Transmission und Transflexion ermöglichen demgegenüber die Messung schwach absorbierender Proben durch entsprechende Wahl der Probendicke. Ein Vorteil von Transflexion gegenüber Transmission ist, dass die benötigten Probenträger nach [BBL⁺09] deutlich günstiger und robuster sind. Diffuse Reflexion ist nach [GH07, S. 355] beispielsweise gut zur Messung pulverartiger Proben geeignet.

2.5 Strahlungsdetektoren

2.5.1 Grundprinzipien

In der Infrarotspektroskopie werden photoelektrische und thermische Detektoren verwendet [SH08, S. 69] [ST08, S. 146 ff., S. 901]. Im Vergleich zu thermischen Detektoren sind photoelektrische Detektoren i. d. R. teurer, dafür schneller und sensitiver [Grb08, S. 2] [Wü10, S. 1] [Gro05, S. 345] [GH07, S. 146, S.149] [ST08, S. 901] [Smi98, S. 46].

Bei thermischen Detektoren wird auftreffende Strahlung in Wärme umgewandelt. Die damit verbundene Temperaturerhöhung kann detektiert werden, z.B. in Form einer elektrischen Widerstandsveränderung bei einem sogenannten *Bolometer* [Gro05, S. 345] [Boy83, S. 106 ff.].

Photoelektrische Detektoren hingegen beruhen auf dem photoelektrischen Effekt (Photoeffekt). Dieser Effekt beschreibt die durch Photonenabsorption bedingte Anregung von Elektronen eines Materials in höhere Energieniveaus und die damit verbundene Erzeugung beweglicher Ladungsträger. Durch elektrische Felder werden diese Ladungsträger bewegt und somit ein messbarer elektrischer Strom erzeugt [ST08, S. 901].

In der MIR-Spektroskopie verwendete Photodetektoren sind Photoleiter und Photodioden [ST08, S. 901 f.] [Vig13]. Der prinzipielle Unterschied zwischen diesen beiden Detektorarten ist, dass die Halbleiterschichten von Photodioden im Gegensatz zu Photoleitern Bereiche unterschiedlicher Dotierung aufweisen, z.B. in Form eines pn-Übergangs [ST08, S. 781, S. 919 ff.]. Nach [ST08, S. 920] sind Photodioden im Allgemeinen schneller als Photoleiter, nach [Bas95, S. 15.7] zudem rauschärmer.

2.5.2 Bauweisen photoelektrischer Detektorsysteme

Photodetektoren kommen sowohl als Einzel- als auch als Arraydetektoren (englisch *focal plane array*, FPA) zur Anwendung (s. Tabelle 1.2 in Abschnitt 1.4.3) [ST08, S. 935] [Bas09]. Nach [GH07, S. 149] werden für die Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich als photoelektrische Detektoren vor allem Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektoren (HgCdTe bzw. englisch *mercury cadmium telluride*, MCT) verwendet [TBC⁺99, Rog05]. Nach [GH07, S. 150] kann mit MCT-Detektoren Strahlung bis zu 33 μm detektiert werden, während Detektoren aus alternativen Materialien, wie z.B. Bleiselenid (PbSe) oder Indiumantimonid (InSb), nur bis unter 6 μm gebaut werden.

MCT-Detektoren werden je nach Anforderung bei Raumtemperatur (300 K) betrieben, bei ein- oder mehrstufiger thermoelektrischer¹⁴ Kühlung (z.B. 195 – 230 K), bei Kühlung mit flüssigem Stickstoff (77 K) und auch bei Kühlung mit flüssigem Helium (4,2 K) [GH07, S. 149] [Vig13, S. 2] [Pio04]. Die Kühlung hat z.B. entscheidenden Einfluss auf die Detektorsensitivität [Vig13, S. 6].

2.6 Hyperspektrale Bildgebung und Datenverarbeitung

2.6.1 Hyperspektrale Bildgebung

Spektrale Bildgebung kombiniert eindimensionale spektrale Information mit zweidimensionaler räumlicher Information¹⁵ [CKL⁺98]. Diese drei Dimensionen werden als „multi-“ oder „hyperspektraler“ Würfel (englisch *hyperspectral cube*) bezeichnet [CKL⁺98, FLBH03]. Ein hyperspektraler Würfel ist beispielhaft in Abbildung 2.11a skizziert.

Nach [CKL⁺98] besteht der Unterschied zwischen einem multi- und einem hyperspektralen System darin, dass bei einem multispektralen System die spektrale Information aus mehreren spektralen Bändern besteht, die sich jedoch nicht zwangsläufig überlappen müssen. Solche Systeme beinhalten nach [CKL⁺98] z.B. Bandpassfilter, die einzelne Bereiche mit Bandbreiten von mehreren zehn bis mehreren hundert Wellenzahlen aus einer breitbandigen Lichtquelle herausfiltern. Hyperspektrale Systeme hingegen beinhalten statt der Bandpassfilter Interferometer oder dispersive Elemente, die eine höhere spektrale Information ermöglichen.

Der Vorteil spektraler Bildgebung gegenüber der Generierung von Einzelpunktspektren ist, dass die räumliche Verteilung molekularer Bestandteile einer Probe ermittelt werden kann [WN05, LN06, KLL97].

Im Rahmen hyperspektraler Bildgebung existieren verschiedene Möglichkeiten Ortsinformation zu generieren¹⁶:

- Rein scannende Systeme bestehen aus einem Einzeldetektor und einer Scaneinheit. Ein Bild entsteht, indem die Strahlung zeitlich sequentiell unterschiedliche Orte der Probe erfasst und die Spektren somit für jeden Ort einzeln nacheinander aufgenommen werden [CKL⁺98] [GH07, S. 308]. Diese Methode ist in Abbildung 2.11b skizziert.

¹⁴Erzeugung einer Temperaturdifferenz durch eine Spannung unter Verwendung bestimmter Werkstoffpaare [HBG05, S. 309].

¹⁵In Ausnahmen auch dreidimensionaler räumlicher Information unter Verwendung von Synchrotronstrahlung, z.B. bei [MDBU⁺13]

¹⁶Bei [GH07, S. 312] werden lediglich auf Arraydetektoren basierende Systeme als Hyperspektralsysteme bezeichnet. [LF14] [GG07, S. 6] zählen jedoch auch scannende Systeme zu dieser Kategorie. Letzterer Auslegung wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefolgt.

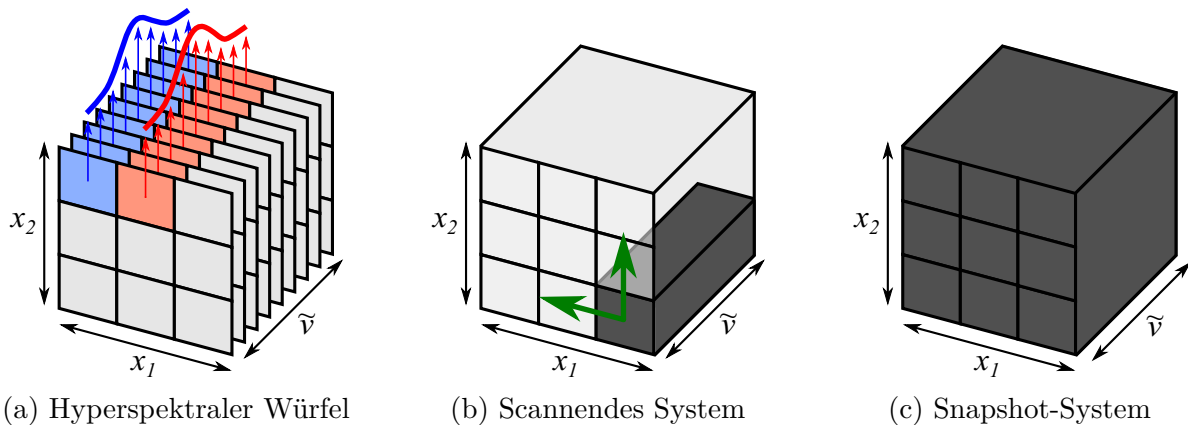


Abbildung 2.11: (a) Zweidimensionale räumliche Information (x_1 , x_2) und eindimensionale spektrale Information ($\tilde{\nu}$) ergeben einen „hyperspektralen Würfel“; beispielhafte Darstellung für zwei verschiedene Spektren an zwei verschiedenen Orten (rot und blau); in Anlehnung an [CKL⁺98]. (b) Räumlich scannendes System: Es wird für jeden Ort ein eigener spektraler Scan durchgeführt; in Anlehnung an [GG07, S. 6]. (c) „Snapshot“-System unter Verwendung eines Arraydetektors (FPA): Es wird für alle Orte simultan ein einziger spektraler Scan durchgeführt.

- Reine „Snapshot-Systeme“ beinhalten einen Arraydetektor (FPA, s. Abschnitt 2.5.2), mit dem es möglich ist, die Spektren für alle Orte zeitlich simultan aufzunehmen [Bha07, CKL⁺98]. Diese Methode ist in Abbildung 2.11c skizziert.

Nach [SK99] zeigen FPAs ein höheres Rauschverhalten als Einzeldetektoren und sind deutlich teurer als vergleichbare Einzeldetektoren [GH07, S. 312] [CKL⁺98]. Jedoch zeigen scannende Systeme in der Praxis längere Aufnahmezeiten sowie niedrigere Auflösung bei Verwendung in der Infrarotmikroskopie (s. Abschnitt 1.4.3) [FBHL05, WN05, KSG⁺06, WKM14].

Neben den beiden Reinformen scannendes und Snapshot-System existieren Zwischenformen. Beispielsweise kann eine Probe mit einem Zeilendetektor oder auch einem zweidimensionalen Arraydetektor gescannt werden [CKL⁺98].

2.6.2 Bildverarbeitung hyperspektraler Daten

Uni- und multivariate Methoden

Die in spektralen Würfeln enthaltene Information ist i. d. R. ohne Expertenwissen nicht unmittelbar ersichtlich. Aus diesem Grund ist die Interpretation durch einen Experten oder die Anwendung von Datenverarbeitung notwendig. Datenverarbeitungsmethoden ermöglichen eine

schnelle und objektive Interpretation der in einem spektralen Würfel enthaltenen Information und lassen sich einteilen in „uni-“ und „multivariate“ Methoden.

Bei der Verwendung **univariater Methoden** wird im Gegensatz zu multivariaten Methoden lediglich eine einzige spektrale Variable betrachtet [Kes07, S. 7]. Beispiele für eine solche Variable sind das Verhältnis der Absorptionswerte bei zwei bestimmten Wellenlängen, die Breite einer Absorptionsbande bei einer bestimmten Wellenlänge oder die Wellenlänge bei einem bestimmten Absorptionsmaximum [FBHL05, WCY⁺04]. Beispielsweise werden beim sogenannten „Chemical Mapping“ die räumlich aufgelösten Absorptionswerte bei einer bestimmten Wellenlänge verwendet, um auf chemische Bestandteile der Probe zu schließen [LHL⁺02, PD06]. Das Ergebnis der Anwendung univariater Methoden können z.B. Graustufenbilder sein, bei denen die Graustufen mit den Ausprägungen der Variablen korrelieren.

Bei der Verwendung **multivariater Methoden** hingegen werden mehrere Variablen in die Auswertung mit einbezogen [Kes07, S. 7] [WCY⁺04]. Solche Methoden werden z.B. verwendet, wenn Unterschiede zwischen Spektren verschiedener Klassen so gering sind, dass sie durch univariate Methoden nicht unterschieden werden können [BSS⁺05] oder wenn zwischen mehreren unterschiedlichen Bestandteilen wie z.B. Drüsengewebe, Schleimhaut, Tumorgewebe oder auch zwischen unterschiedlichen Tumorgeweben unterschieden werden soll [LHL⁺02, FBHL05, BMR⁺12].

Eine weitere Anwendung ist die Datenreduktion, z.B. bei Verwendung der *Hauptkomponentenanalyse* (engl. „principal component analysis“, PCA). Diese berechnet aus Ausgangsdaten (Merkmale, Variablen) neue latente Variablen (z.B. „PC1“ und „PC2“), die *Hauptkomponenten* genannt werden und die eine Linearkombination der ursprünglichen Variablen darstellen [Kes07, S. 22 ff.]. Indem viele beobachtete Merkmale auf wenige Hauptkomponenten reduziert werden, kann z.B. der Aufwand bei Gewebeunterscheidungen reduziert werden, wie im Laufe der Arbeit gezeigt wird.

Das Ergebnis der Anwendung multivariater Methoden sind beispielsweise Falschfarbenbilder, bei denen jede Farbe eine bestimmte Gewebeart repräsentiert (s. Abbildung 1.3).

Spektrenvorverarbeitung

Um Störgrößen zu reduzieren, werden Spektren vor der Anwendung uni- oder multivariater Methoden i. d. R. vorverarbeitet. Darunter fallen beispielsweise folgende Prozesse [Kes07, S. 183 ff.] [GH07, S. 225 ff.] [MDS⁺07, LHL⁺02, PWB⁺09]:

- Rauschreduktion durch Tiefpassfilter oder Glättungsalgorithmen.

- Basislinienkorrektur, z.B. um Streuprozesse zu korrigieren.
- Normierung, z.B. auf den Absorptionswert bei einer bestimmten Wellenlänge. Dies geschieht beispielsweise bei Transmissionsmessungen (s. Abschnitt 2.4.2), um den Einfluss unterschiedlicher Probenschichtdicken zu verringern.
- Ableitungen, z.B. um überlagernde Banden sichtbar zu machen oder zur Basislinienkorrektur.

Auf einzelne dieser Prozesse, die für die vorliegende Arbeit relevant sind, wird in den jeweiligen Abschnitten näher eingegangen.

3 Lösungsansatz: Bildgebende Infrarotspektroskopie unter Verwendung von Quantenkaskadenlasern und abgeschwächter Totalreflexion

3.1 Zielsetzung und erwartete Lösungseigenschaften

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Funktionsdemonstrators, der Gewebedifferenzierung ungetrockneter, frischer Gewebeproben („in vivo-Bedingung“) auf Grundlage bildgebender Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR) ermöglicht. Es wird dadurch ein Weg gezeigt wie Tumor- von gesundem Gewebe intraoperativ und in vivo unterschieden werden kann (s. Abschnitt 1.5).

Die Konzeptbestandteile sollen das Potenzial erkennen lassen, mit technischem Fortschritt oder erhöhtem Entwicklungsaufwand zukünftig intraoperativ klinisch eingesetzt werden zu können. Es ist diesbezüglich nicht Ziel der Arbeit, ein Instrument für erste klinische Untersuchungen zu realisieren, sondern vielmehr einen Machbarkeitsnachweis zu erbringen.

Folgende Aspekte sind für einen zukünftigen intraoperativen Einsatz zu berücksichtigen:

- Lösung der **Wasserproblematik**: In Abschnitt 1.4.1 ist der starke Wassereinfluss im mittleren Infrarotbereich beschrieben. Bei [BGM⁺03] wurde für diffuse Reflexionsmessungen an Gewebe gezeigt, dass Absorptionsbanden bei Wasserschichtdicken von lediglich 2 μm bereits fast vollständig unterdrückt werden. Für eine in vivo-Anwendung an feuchtem Gewebe ist es daher notwendig, den spektralen Einfluss von Wasser zu reduzieren.
- Lösung der **Bewegungsproblematik**: Für eine ausreichend scharfe Bildaufnahme sind Relativbewegungen zwischen Bildgebungssystem und Patient zu minimieren. Relativbewegungen können z.B. durch Patientenbewegung aufgrund von Atmung entstehen.
- Folgende Bildgebungseigenschaften sind für einen intraoperativen Einsatz notwendig:

- Eine hohe **Bildaufnahmegeschwindigkeit**, um den Bildgebungsprozess in den Arbeitsablauf einer Operation zu integrieren. Es soll potenziell möglich sein, ein Bild innerhalb mehrerer Sekunden oder sogar in Echtzeit aufzunehmen. Mit dem im Rahmen der Arbeit verwendeten breit durchstimmbaren Quantenkaskadenlaser der ersten Generation aus dem Jahr 2013 ist diese Anforderung aufgrund langsamer Durchstimmgeschwindigkeiten noch nicht möglich. Neuere Laser der zweiten Generation aus dem Jahr 2014 sind diesbezüglich jedoch bereits erheblich schneller (s. Abschnitt 3.6.1).
- Eine **Bildgröße** von Quadratmillimetern bis Quadratzentimetern entspricht der Größenordnung eines Tumors [BDHM08a, S. 169 ff.] und ermöglicht dem Chirurgen somit einen Überblick über den Resektionsbereich.
- Eine **Ortsauflösung** im Bereich von 0,1 mm bis 1 mm entspricht nach [KSSK10, SSK⁺11] der Größenordnung, in der ein Chirurg unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops Gewebe entfernt. Höhere Auflösungen sind daher nicht notwendig.
- **Geringes Gewicht und Volumen** sind notwendig für einen intraoperativen Einsatz, um das Gerät handgeführt und ohne Umbauaufwand an verschiedenen Operationsorten verwenden zu können (maximal wenige Kilogramm, handliche Größe). Ebenso erhöht eine **einfache Bedienbarkeit** die Akzeptanz durch medizinisches Personal.
- Die **Strahlenbelastung** sollte unterhalb entsprechender Grenzwerte liegen, um Gewebeschädigung am Patienten zu vermeiden.

3.2 Spektrometerkonzept

Auf Grundlage der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Zielsetzung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Spektrometerkonzept entwickelt, das in Abbildung 3.1 gezeigt ist. Auf die Auswahl der einzelnen Komponenten wird im Folgenden näher eingegangen.

3.2.1 Lösung der Wasser- und Bewegungsproblematik

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die in Abschnitt 3.1 beschriebene Wasser- und Bewegungsproblematik durch Messung in einem spektralen Fenster mit reduziertem Wassereinfluss und der Verwendung von abgeschwächter Totalreflexion (ATR) gelöst wird.

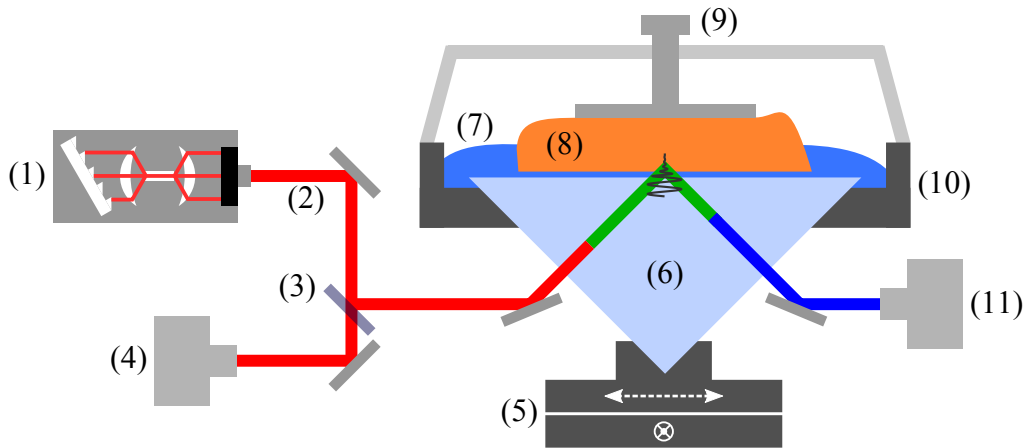


Abbildung 3.1: Übersicht über den statischen Spektrometeraufbau: (1) Durchstimmbarer Quantenkaskadenlaser, (2) Strahlung, (3) Strahlteiler, (4) Detektor D2 zum Messen von Laserintensitätsschwankungen, (5) Kreuztisch zur Realisierung eines scannenden Systems, (6) ATR-Kristall, (7) Wasser, (8) Probe, (9) Anpressvorrichtung, (10) Becken für Messungen in wässriger Umgebung, (11) Detektor D1 zum Messen des Probensignals.

Wie in Abschnitt 3.1 erwähnt, ist die Vermessung ungetrockneter Proben aufgrund des starken Wassereinflusses im mittleren Infrarotbereich schwierig. Es existiert jedoch eine Region zwischen ca. 1500 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} , dargestellt in Abbildung 3.2, in der die Spektrengenerierung von ungetrocknetem Gewebe vereinfacht wird. Dafür gibt es folgende Gründe:

- Die Wasserabsorption in diesem spektralen Fenster ist im Vergleich zu dessen Umgebung relativ gering.
- Die Wasserabsorption in diesem Bereich ist vergleichsweise konstant.
- Ein Großteil des Fingerprint-Bereichs (s. Abschnitt 2.1.3) überschneidet sich mit dieser Region; sie enthält somit eine hohe spektrale Informationsdichte.

Trotz dieser Eigenschaften ist die Wasserabsorption allerdings auch in diesem spektralen Fenster so hoch, dass bereits Wasserschichtdicken von wenigen Mikrometern Gewebesignale praktisch vollständig überlagern [BWZM02].

Der Ansatz der vorliegenden Arbeit ist daher, auf lebendem Gewebe vorhandene Wasserschichten durch die Verwendung eines ATR-Kristalls zu verdrängen (s. Abbildungen 3.1 und 3.2). Spektren von feuchtem Gewebe zeigen in diesem Fall spektrale Gewebeinformation, überlagert mit spektraler Wasserinformation. Im Spektralbereich des reduzierten Wassereinflusses ist somit die Gewebeinformation aufgrund der konstanten Absorption vergleichsweise gut zu extrahieren.

Die anderen in Abschnitt 2.4 beschriebenen Messmethoden Transmission, Transflexion und dif-

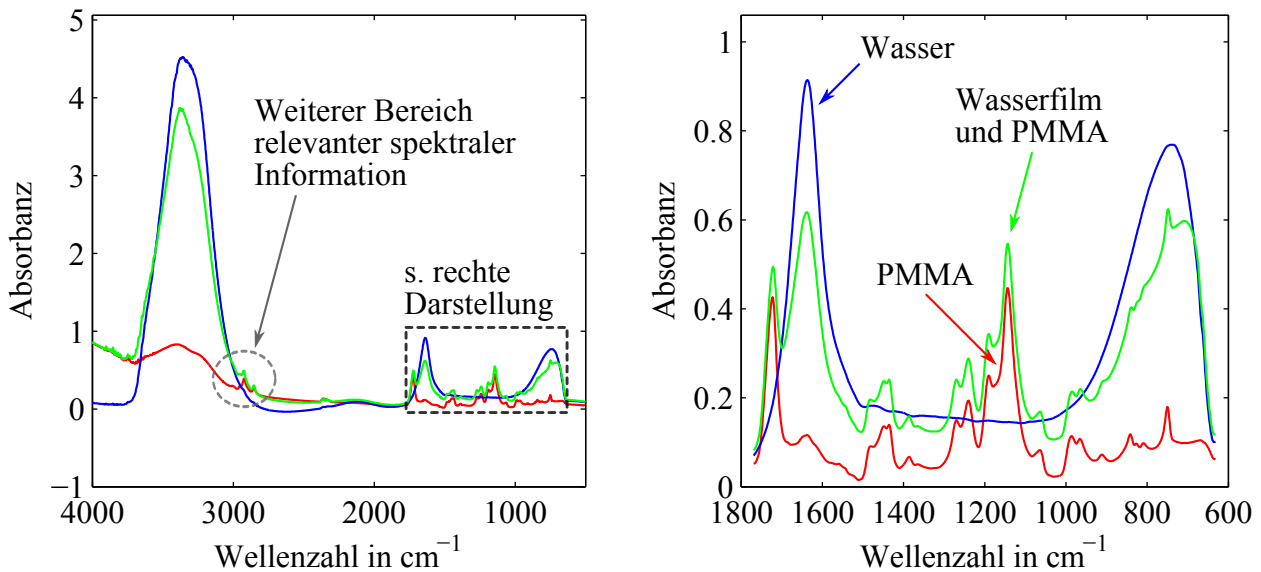


Abbildung 3.2: Überlagerung von Wasser- und Probeninformation (Polymethylmethacrylat, PMMA) bei Verwendung von Wasserverdrängung durch ATR (grüne Kurve). Ein Bereich hoher spektraler Informationsdichte und konstanter, vergleichsweise niedriger Wasserabsorption existiert zwischen ca. 1500 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} (Teil des Fingerprintbereichs, s. rechte Darstellung). Spektrale Probeninformation existiert zudem im Bereich etwas unterhalb von 3000 cm^{-1} (s. linke Darstellung), jedoch in geringerem Maße als im Bereich ab 1500 cm^{-1} . Die Positionen der gezeigten Bereiche spektraler Information sind vergleichbar mit denen von Gewebespektren. Die vergleichsweise hohe Absorbanz (s. Abschnitt 2.1.3) resultiert aus der Verwendung eines Mehrfachreflexionskristalls (s. Abbildung 2.9b) mit sieben Reflexionen. Die Messung wurde mit einem FTIR-Spektrometer durchgeführt (s. Abschnitt 3.7.1).

fuse Reflexion bieten diese Möglichkeit der Wasserverdrängung nicht, zumal die ersten beiden Methoden für einen in vivo Einsatz nicht verwendet werden können, da im mittleren Infrarotbereich lebendes Gewebe aufgrund der hohen Absorption nicht durchdrungen wird.

Neben der Wasserverdrängung ist ein weiterer Vorteil von ATR gegenüber den anderen Messmethoden, dass aufgrund der Reibungskräfte zwischen angepresstem Kristall und Patient Relativbewegungen zwischen Messsystem und Patient¹ reduziert werden. Zum Aufbringen des Anpressdrucks zwischen Probe und ATR-Kristall wird eine Anpressvorrichtung verwendet, wie in Abbildung 3.1 gezeigt.

Aufgrund der Wasserverdrängungsmöglichkeit sowie der Reduzierung von Relativbewegungen zwischen Messsystem und Patient wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit abgeschwächte

¹Dies bezieht sich auf die spätere Anwendung im OP. Im Rahmen der Arbeit wird, wie erwähnt, kein klinisch einsetzbares Gerät realisiert, sondern ein Machbarkeitsnachweis erbracht.

Totalreflexion verwendet. In Verbindung mit dem erwähnten Spektralbereich des reduzierten Wassereinflusses zwischen ca. 1500 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} ist so die Spektrengenerierung von feuchtem Gewebe möglich, wie im Laufe der Arbeit gezeigt wird. Es wird dabei ein Einfachreflexionskristall verwendet, da das Ziel dieser Arbeit Bildgebung ist (s. Abbildung 2.9a). Der Kristall befindet sich, wie in Abbildung 3.1 gezeigt, in einer Vertiefung, so dass Proben auch in wässriger Umgebung vermessen werden können.

3.2.2 Spektrometerprinzip und Strahlungsquelle

In diesem Abschnitt werden die Vorteile eines QCL-Spektrometers in Bezug auf intraoperative Gewebedifferenzierung aufgezeigt und ein Vergleich zu FTIR-Spektrometern gezogen.

Wie in den Abschnitten 2.2 und 2.3 beschrieben, existieren verschiedene Strahlungsquellen und Spektrometerprinzipien, um Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR) zu betreiben. Etabliert für die MIR-Spektroskopie über einen breiten Wellenlängenbereich sind aufgrund der in den genannten Abschnitten beschriebenen Eigenschaften vor allem drei Konfigurationen:

- FTIR-Spektroskopie unter Verwendung eines Temperaturstrahlers (Globalar) als Strahlungsquelle (z.B. [LHL⁺02]).
- FTIR-Spektroskopie unter Verwendung einer Synchrotronstrahlungsquelle (z.B. [FBHL05]).
- Die Verwendung eines breitbandigen Quantenkaskadenlasers (QCL) in Verbindung mit einem Beugungsgitter als wellenlängenselektierendem Element (z.B. [YKLB15]).

Die Verwendung von Synchrotronstrahlung wird aufgrund des benötigten Teilchenbeschleunigers im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter betrachtet. Mit „FTIR-Spektrometer“ wird daher im Folgenden die auf einem Globalar basierende Konfiguration bezeichnet, mit „QCL-Spektrometer“ die auf einem breitbandigen QCL und einem Beugungsgitter basierende Konfiguration.

Zum Zeitpunkt der Konzeptauswahl verfügbare breit durchstimmbare QCL-Systeme der ersten Generation aus dem Jahr 2013 (z.B. [Day13b]) zeigen vor allem in folgenden Bereichen Verbesserungspotenzial:

- Die Lasersysteme weisen zeitabhängige Intensitätsschwankungen und Strahlungeinstabilitäten auf, wodurch die Genauigkeit spektroskopischer Messungen begrenzt wird (s. z.B. Abschnitt 3.6.1).
- Die Zuordnung der emittierten Strahlung zu bestimmten Wellenlängen ist bei schnellen spektralen Scans problematisch (s. Abschnitt 3.6.2).

- Die Durchstimmgeschwindigkeiten der Laser sind vergleichsweise langsam, da mehrere bis mehrere zehn Sekunden für einen spektralen Scan innerhalb des Fingerprintbereich, z.B. von 1700 cm^{-1} bis 900 cm^{-1} , benötigt werden (s. Abschnitt 3.6.1).
- Im Vergleich zu FTIR-Spektrometern zeigen QCL-Systeme eine vergleichsweise geringe spektrale Bandbreite. Mit einem FTIR-Spektrometer kann ein Spektrum über den gesamten mittleren Infrarotbereich von 4000 cm^{-1} bis etwa 400 cm^{-1} aufgenommen werden. QCL-Systeme sind zwar prinzipiell für den gesamten MIR-Bereich erhältlich, jedoch betragen die zum Zeitpunkt der Konzeptauswahl in einem einzigen Gerät erhältlichen Durchstimmbereiche maximal etwa 1000 cm^{-1} (z.B. von 1700 cm^{-1} bis 800 cm^{-1} bei [Day13b]). Beispielsweise für die Anwendung von Wasserkorrektionsalgorithmen reicht dieser Spektralbereich nicht aus [PWJ86, DTP89, RH97].

Für die Zukunft ist allerdings davon auszugehen, dass die Leistungsfähigkeit von QCL-Systemen in den genannten Bereichen deutlich höher sein wird. Beispielsweise ermöglichen aktuelle QCL-Systeme aus dem Jahr 2014 bereits Durchstimmgeschwindigkeiten von nur noch mehreren zehn Millisekunden statt mehreren zehn Sekunden für einen Scan des Fingerprintbereichs von ca. 1800 cm^{-1} bis 800 cm^{-1} (s. Abschnitt 3.6.1).

Aufgrund dieses hohen Potenzials sowie aufgrund der folgend genannten Vorteile gegenüber FTIR-Spektrometern, beinhaltet das Konzept der vorliegenden Arbeit ein QCL-Spektrometer (s. Abbildung 3.1). Die folgenden Vorteile gelten insbesondere vor dem Hintergrund einer intraoperativen Anwendung:

- **Geringeres Gewicht und Volumen:** Zum Zeitpunkt der Konzeptauswahl aktuelle, breit durchstimbare (über einen Bereich von ca. 1000 cm^{-1}) QCL-Systeme der ersten Generation wiegen ca. 20 kg und haben Abmessungen von ca. $45 \times 25 \times 16\text{ cm}^3$ [Day13b]. Neuere QCL-Systeme der zweiten Generation verfügen bereits über ein Gewicht von lediglich 2 kg und Abmessungen von ca. $16 \times 13 \times 13\text{ cm}^3$ [Blo14]. Mit QCL-Systemen verwendete, thermoelektrisch gekühlte Detektoren erhöhen das Gesamtgewicht nicht entscheidend. Auch wenn es sehr leichte und kleine FTIR-Spektrometer gibt², ist das Gewicht rauscharmer FTIR-Spektrometer, die mit stickstoffgekühlten Detektoren betrieben werden, deutlich höher. Beispielsweise wiegt das Spektrometer *Vertex 80v* der Firma Bruker Optik (Ettlingen, D.) ca. 120 kg und hat Abmessungen von $85 \times 70 \times 31\text{ cm}^3$ [Bru06].
- Aufgrund der deutlich höheren spektralen Leistungsdichten von QCLs können für rauscharme Spektroskopie **thermoelektrisch gekühlte Detektoren** anstelle von stickstoffgekühlten Detektoren (s. Abschnitt 2.5.2) verwendet werden. Dadurch wird die Bedienbar-

²Beispielsweise das Spektrometer *4100 ExoScan* der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit einem Gewicht von 3,2 kg.

keit vereinfacht, indem die Stickstofflogistik sowie das zeitaufwändige Befüllen des Detektorstickstoffbehälters zusammen mit entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen entfällt. Zudem wird durch den Wegfall des Stickstoffbehälters und dessen Inhalt das Gesamtgewicht reduziert.

- Vereinfachte Bedienbarkeit des Systems aufgrund einer **schnelleren Verfügbarkeit**. Bei [Bru06, S. 37] wird als Zeit für die thermische Stabilisierung eines Globars eine Dauer von 10 min nach dem Einschalten genannt. Für die Praxis werden vom genannten Spektrometerhersteller Bruker allerdings Zeiten von bis zu 60 min empfohlen. Die Laserkavitäten eines zum Zeitpunkt der Konzeptauswahl aktuellen breit durchstimmbaren QCL-Systems [Day13b] werden vor dem Anschalten der Laserstrahlung mittels Peltierelemente auf eine konstante Betriebstemperatur gekühlt. Die Dauer dafür liegt bei etwa 30 s.
- Die im Vergleich zu Globars **höhere Strahlqualität** der Laserstrahlung und die daraus resultierende bessere Fokussierbarkeit. Dies ist beispielsweise bei scannenden Systemen in Bezug auf Ortsauflösung relevant.

3.2.3 Bildgebungsprinzip und Strahlungsdetektion

In diesem Abschnitt wird die Verwendung eines scannenden Systems in Kombination mit zwei Einzeldetektoren beschrieben. Der Vorteil des Einsatzes von zwei Detektoren ist, dass einer der beiden zur Messung der Probenabsorption, der andere zur Messung von Laserintensitätsschwankungen verwendet werden kann. Dadurch ist es möglich, Rauscheinflüsse zu reduzieren.

In Abschnitt 2.6.1 wurden verschiedene Möglichkeiten der Generierung von Ortsinformation gezeigt. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen, beinhaltet das Konzept der vorliegenden Arbeit ein scannendes System unter Verwendung von zwei Einzeldetektoren. Das Scansystem besteht aus einem Kreuztisch, der den ATR-Kristall bei statischem Strahlengang bewegt.

In den Lösungszielen (Abschnitt 3.1) wurde eine Bildgröße im Quadratmillimeter- bis Quadratzentimeterbereich sowie eine Ortsauflösung im Millimeterbereich angegeben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden daher 64 Orte in einer Fläche von $8 \times 8 \text{ mm}^2$ mit einer Schrittweite von 1 mm in beide Richtungen gescannt. Im Hinblick auf den Charakter einer Machbarkeitsstudie der vorliegenden Arbeit ist dies ein Kompromiss zwischen Aufnahmedauer und Bildgröße.

Neben dem in Abschnitt 2.6.1 genannten Vorteil geringerer Kosten scannender Systeme, v.a. im Hinblick auf den Machbarkeitsstudiencharakter, ermöglicht die Verwendung zweier Einzeldetektoren die Reduktion des Spektrometerrauschens. Dies geschieht, wie in Abbildung 3.1 gezeigt, indem der Strahlengang vor Probenkontakt geteilt wird. Der erste Teilstrahl wird vor der Detektion im ATR-Kristall reflektiert und enthält somit die Probeninformation. Der zweite

Teilstrahl wird ohne Probenkontakt detektiert und zur Messung von Laserpulsschwankungen verwendet. Für ausreichend sensitive Messungen ist diese Referenzmessung notwendig, da aktuelle QCL-Systeme wie erwähnt starke Intensitätsschwankungen zeigen (s. auch Abschnitte 3.6.1 und 3.7.3). Die Alternative, Mittelung über mehrere Messungen [BSG⁺13], würde unerwünscht die Aufnahmezeit erhöhen. In Abschnitt 3.3.1 wird auf die Korrektur der Laserintensitätsschwankungen näher eingegangen.

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass bei Verwendung von Arraydetektoren (FPAs) diese Form der Referenzmessung nicht möglich wäre, da FPAs den Strahl räumlich aufgelöst detektieren und die Pixel der beiden Detektoren in Bezug auf das räumliche Laserstrahlprofil einander nur eingeschränkt zugeordnet werden könnten.

Aus den bereits in Abschnitt 3.2.2 genannten Gründen, wie z.B. einfachere Handhabbarkeit, werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit thermoelektrisch (TE) gekühlte Photodetektoren (s. Abschnitt 2.5.2) verwendet. Durch eine Rauschabschätzung in Abschnitt 3.6.1 sowie durch experimentelle Untersuchungen in Abschnitt 3.7.3 wird gezeigt, dass die Sensitivitäten TE-gekühlter Detektoren für die in Kapitel 4 beschriebenen Gewebemessungen ausreichend sind.

Zum Zeitpunkt der Konzeptauswahl³ aktuelle, breit durchstimmbare QCL-Systeme enthalten gepulste Laserkavitäten mit maximalen Pulslängen von 500 ns bei einem Puls-Pausen-Verhältnis⁴ von 5% (s. Abschnitt 3.6.1) [Day13b, Blo14]. Die Verwendung schneller Photodetektoren ermöglicht im Gegensatz zu langsamen und auch weniger sensitiven thermischen Detektoren die Laserpulserfassung innerhalb eines schmalen Aufnahmezeitfensters, wie in Abbildung 3.3 gezeigt. In den nächsten Abschnitten wird, ausgehend von diesen Laserpulsen, beschrieben, wie ein hyperspektrales Bild entsteht.

3.3 Konzept der spektralen Bildaufnahme mittels simultaner Detektion

In diesem Abschnitt wird der Weg von emittierten Laserpulsen zu einem hyperspektralen Bild skizziert. Dabei wird zunächst in Abschnitt 3.3.1 darauf eingegangen, wie ein Absorbanzspektrum für einen einzelnen Messort generiert wird. Im darauffolgenden Abschnitt 3.3.2 wird dann darauf eingegangen, wie aus mehreren solcher Absorbanzspektren, die an verschiedenen Messorten aufgenommen wurden, ein Bild berechnet wird.

³Zum Zeitpunkt der Konzeptauswahl in den Jahren 2012 und 2013 waren breit durchstimmbare QCL-Systeme im gewünschten Spektralbereich lediglich als gepulste Laser verfügbar. Inzwischen werden von der Firma *Daylight Solutions* auch passende Systeme im Dauerstrichbetrieb angeboten.

⁴Verhältnis von Pulslänge zur Periodendauer

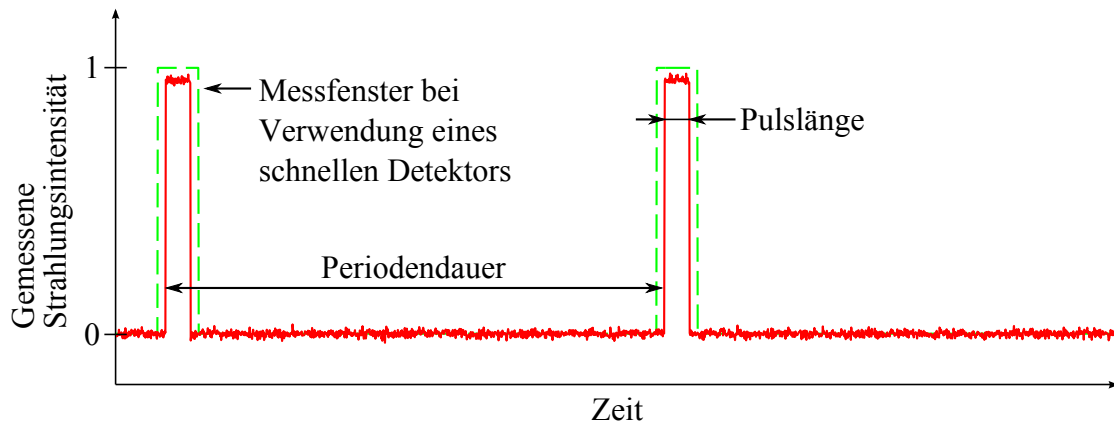


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung von Laserpulsen und dem Aufnahmezeitfenster, das bei Verwendung schneller Detektoren realisiert werden kann.

3.3.1 Spektrenberechnung

In den folgenden beiden Unterabschnitten wird der Weg von Laserpulsen, die sequenziell bei jeweils einer anderen Wellenlänge emittiert werden, zu einem referenzierten Absorbanzspektrum beschrieben. Dabei wird zunächst auf Einkanalspektren (s. Abschnitt 2.1.3) eingegangen, die zueinander *simultan* aufgenommen werden, um Laserpulsschwankungen zu normieren („Referenzierung“). Im Anschluss daran wird auf Einkanalspektren eingegangen, die zueinander *sequenziell* aufgenommen werden, um probenunabhängige spektrale Charakteristiken der Strahlungsquelle und des optischen Aufbaus zu normieren (Berechnung der Absorbanz).

Berechnung von Einkanalspektren aus Rohdaten

Dieser Unterabschnitt beschreibt wie zwei zur gleichen Zeit aufgenommene Einkanalspektren (s. Abschnitt 2.1.3) entstehen, indem die nacheinander bei jeweils einer anderen Wellenlänge emittierten Laserpulse gleichzeitig von zwei Detektoren erfasst werden. Durch die unterschiedlichen Strahlengänge unterscheiden sich diese simultan aufgenommenen Einkanalspektren voneinander.

In Abschnitt 2.1.3 wurde zwischen Einkanal- und Absorbanzspektren unterschieden. Ein Absorbanzspektrum berechnet sich dabei aus zwei *sequenziell* aufgenommenen Einkanalspektren, namentlich einem Hintergrund- und einem Probenspektrum. Wie beschrieben, wird das Probenspektrum mithilfe eines Hintergrundspektrums normiert, um probenunabhängige Einflüsse, z.B. die spektrale Charakteristik der Strahlungsquelle, zu minimieren.

Da jedoch, wie im Laufe des nächsten Unterabschnitts gezeigt, diese Normierung die erwähnten zeitabhängigen Laserintensitätsschwankungen nicht erfasst, wird in der vorliegenden Ar-

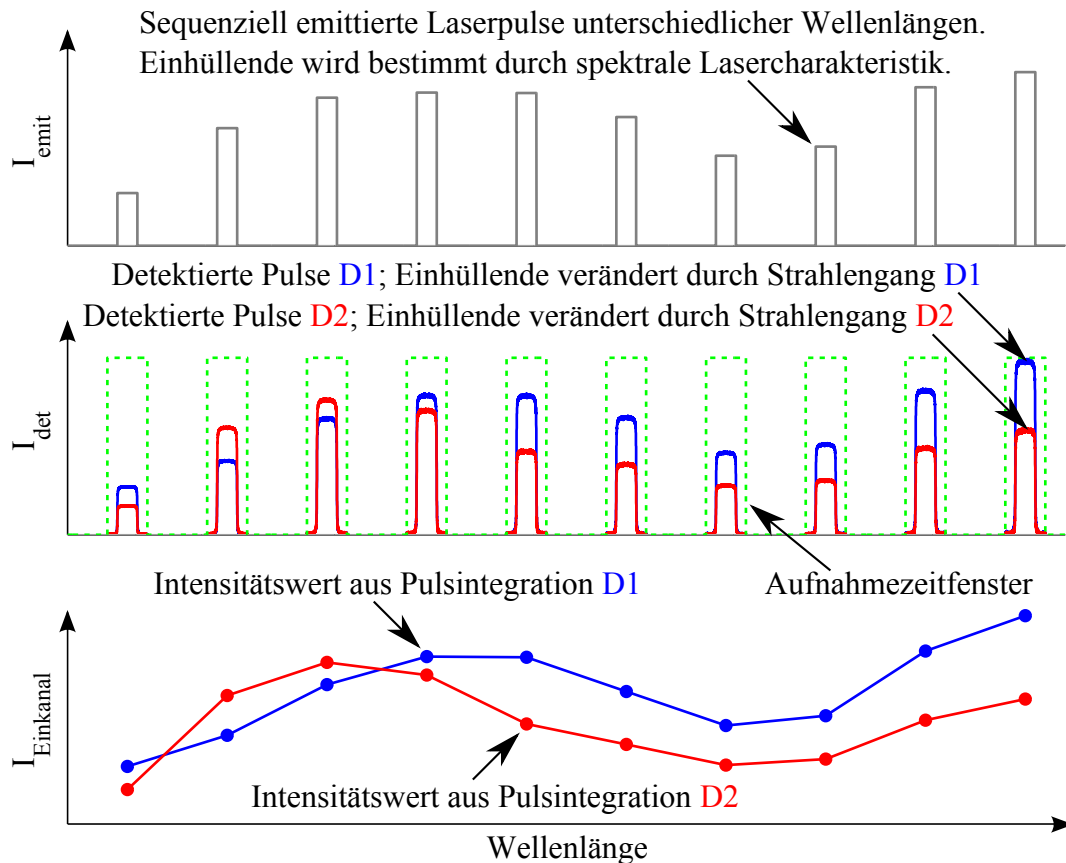


Abbildung 3.4: Berechnung zweier simultan aufgenommener Einkanalspektren aus den Rohdaten. Jeder Laserpuls wird zeitgleich von den beiden Detektoren D1 und D2 detektiert. Die Einhüllenden der Pulse werden bestimmt durch die spektrale Charakteristik von Laser und optischem Aufbau. Die Pulse werden in der Datenverarbeitung durch Integration auf jeweils einen Wert reduziert. Zur Berechnung eines referenzierten Absorbanzspektrums sind jeweils zwei der hier gezeigten simultan aufgenommenen Einkanalspektren notwendig (s. Abbildung 3.5).

beit durch einen zweiten Detektor eine weitere Normierung bzw. Referenzierung durchgeführt. Grundlage dafür ist die im Folgenden beschriebene *simultane* Erfassung von Einkanalspektren durch Detektor D1 und Detektor D2 (s. Abbildung 3.1). Die Beschreibung des eigentlichen Referenzierungsvorgangs geschieht im nächsten Unterabschnitt.

Relevant im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist somit die Unterscheidung zwischen sequenziell aufgenommenen Einkanalspektren (Hintergrund- und Probenspektrum) und simultan aufgenommenen Einkanalspektren (Spektren von Detektor D1 und Detektor D2). Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Arten von Einkanalspektren ist, dass pro Hintergrund- bzw. Probenspektrum (sequenzielle Aufnahme) jeweils zwei simultane Einkanalspektren (Detektor D1 und Detektor D2) aufgenommen werden. Dies wird im folgenden Unterabschnitt näher erläutert.

In Abbildung 3.4 ist das in der vorliegenden Arbeit verwendete Vorgehen zur Generierung zweier simultan aufgenommener Einkanalspektren skizziert. Die nacheinander bei jeweils einer anderen Wellenlänge emittierten Laserpulse (obere Darstellung) werden von den beiden Messkanälen (mittlere Darstellung) innerhalb des Aufnahmezeitfensters (s. auch Abbildung 3.3) erfasst. Trotz Messung der identischen Laserpulse unterscheiden sich die von den beiden Detektoren *aufgenommenen* Laserpulse voneinander. Grund dafür sind die unterschiedlichen Strahlengänge, die zu Detektor D1 bzw. Detektor D2 führen. Beispielsweise durchdringt der erste Teilstrahl den Strahlteiler, während der zweite daran reflektiert wird (s. Abbildung 3.1).

Jeder der in der mittleren Darstellung in Abbildung 3.4 gezeigten Pulse wird durch Berechnung des Pulsintegrals auf einen Wert reduziert. Die resultierenden Werte ergeben, wie in Abbildung 3.4 unten dargestellt, eine Kurve der über die Zeit emittierten Laserintensität. Da das Beugungsgitter kontinuierlich dreht, ist die aufgenommene Intensität wellenlängenabhängig. Es handelt sich somit bei diesen beiden in Abbildung 3.4 unten gezeigten Kurven um zwei simultan aufgenommene Einkanalspektren.

Berechnung eines referenzierten Absorbanzspektrums

In diesem Unterabschnitt wird auf Grundlage der in Abbildung 3.4 gezeigten simultan aufgenommenen Einkanalspektren auf die Berechnung eines *referenzierten* Absorbanzspektrums eingegangen. Ein Absorbanzspektrum entsteht, indem ein Probenspektrum durch ein Hintergrundspektrum geteilt und der Logarithmus des resultierenden Quotienten gebildet wird (s. Abschnitt 2.1.3). Durch diesen Normierungsvorgang wird z.B. der Einfluss der spektralen Charakteristik der Strahlungsquelle auf das resultierende Absorbanzspektrum reduziert, wodurch probenrelevante Informationen hervorgehoben werden. Durch einen weiteren Normierungsvorgang, die Referenzierung mit einem zweiten Detektor, kann ein Absorbanzspektrum so normiert werden, dass die Einflüsse von Laserpulsschwankungen oder anderer probenunabhängiger zeitlicher Effekte minimiert werden. Der erste Normierungsvorgang durch Verwendung eines Hintergrundspektrums reduziert somit *statische* Einflüsse (spektrale Charakteristik der Strahlungsquelle oder des Strahlengangs), der zweite Normierungsvorgang durch Verwendung eines zweiten Detektors reduziert *dynamische* Einflüsse, wie z.B. Laserpulsschwankungen oder Veränderungen der Luftzusammensetzung im Raum.

Abbildung 3.5 zeigt die Funktionsweise der in Abschnitt 3.2.3 genannten Referenzmessung. Messung M1 ist z.B. eine Hintergrundmessung mit leerem ATR-Kristall, Messung M2 z.B. eine Probenmessung mit einer Probe auf dem Kristall. Für den Fall der Verwendung eines Lasers ohne Intensitätsschwankungen und auch sonst idealen Bedingungen wären Unterschiede zwischen zwei sequenziell gemessenen Einkanalspektren (I_{M1D1} und I_{M2D1}) ausschließlich auf Probenab-

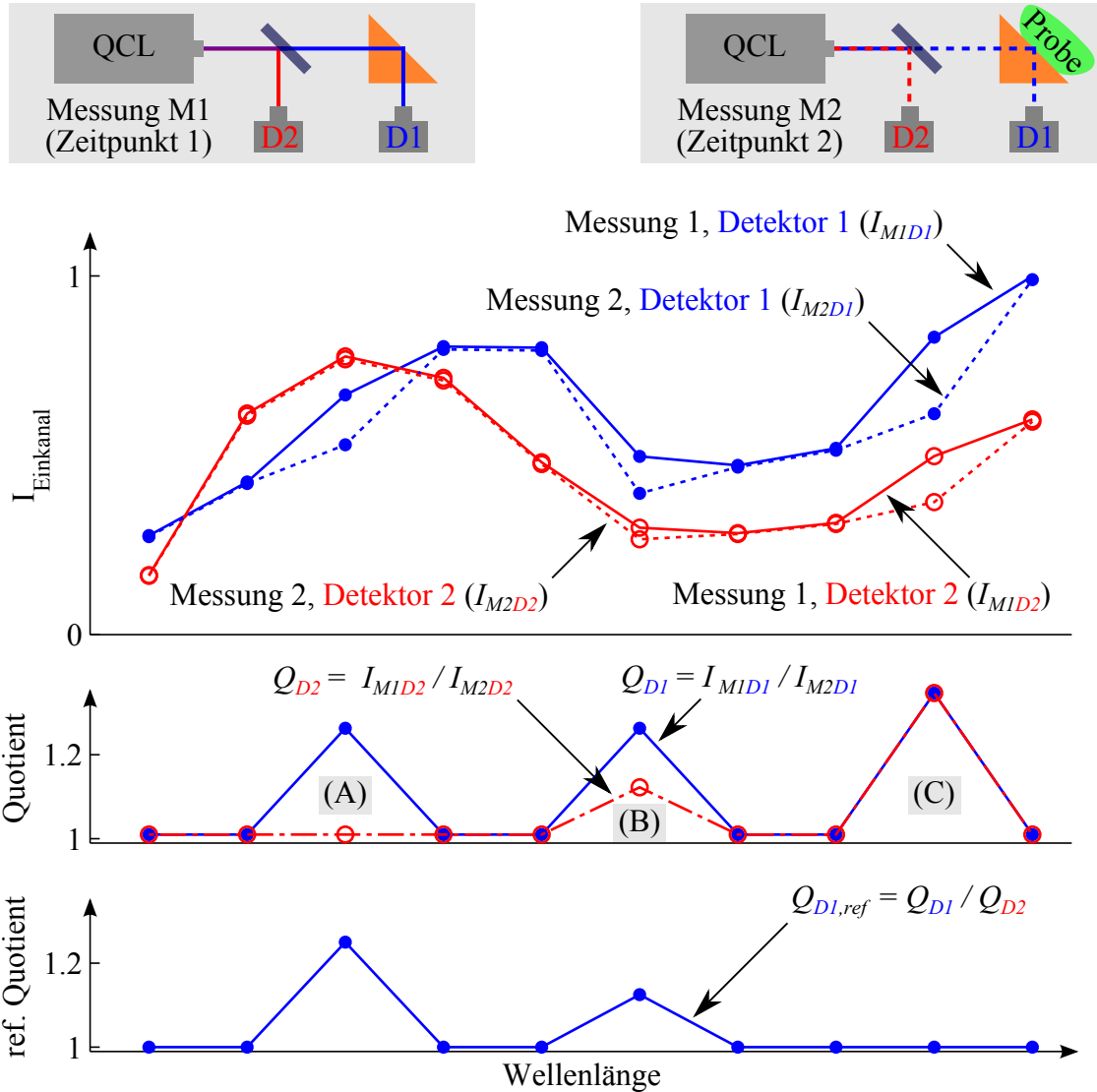


Abbildung 3.5: Funktionsweise der Referenzmessung. Aufnahme einer Hintergrundmessung (M1) und einer Probenmessung (M2) mit jeweils zwei Detektoren (D1 und D2). Wird nur der Probenkanal (D1) betrachtet, sind probenbedingte Intensitätsveränderungen nicht von Laserintensitätsschwankungen zu unterscheiden. Durch Messung der Laserpulsschwankung unter Verwendung eines zweiten Detektors (D2) können probenunabhängige Einflüsse minimiert werden. Die Buchstaben A, B und C kennzeichnen von D1 gemessene Intensitätsveränderungen rein aufgrund von Absorption (A), aufgrund von Überlagerung von Absorption und Laserschwankung (B) und rein aufgrund von Laserschwankung (C).

sorption zurückzuführen.

Allerdings ist im Falle schwankender Laserintensität oder beispielsweise Veränderung der Luft im Strahlengang (z.B. Änderung des Wasserdampfgehalts) ein gemessener Intensitätsunterschied zwischen M1 und M2 für Detektor D1 nicht klar auf entweder Probenabsorption oder Laserschwankungen zurückzuführen. Durch einen zweiten Detektor D2 kann in diesem Fall die

Laserschwankung oder auch die Veränderung der Luft im Raum gemessen und das mit D1 gemessene Signal entsprechend referenziert werden. Dies ist in der mittleren Darstellung in Abbildung 3.5 gezeigt:

Der für die Berechnung eines Absorbanzspektrums nach Gleichung (2.5) notwendige Quotient von Proben- zu Hintergrundspektrum (hier Q_{D1}) zeigt die drei Peaks A, B und C. Ohne Verwendung der Referenzmessung Q_{D2} ist unklar, ob diese drei Peaks jeweils aufgrund von Absorption oder aufgrund von beispielsweise Laserintensitätsschwankungen zustande kommen. Durch den Vergleich zwischen Q_{D1} und Q_{D2} können jedoch Aussagen diesbezüglich getroffen werden:

Der Quotient der Referenzmessung Q_{D2} zeigt an der Stelle des ersten Peaks (A) keine Veränderung zwischen M1 und M2, d.h. es gilt $Q_{D2} = 1$. Bei diesem Peak wurde somit keine Laserintensitätsschwankung o. Ä. gemessen, weswegen nur Probenabsorption der Grund für den Q_{D1} -Peak bei (A) sein kann. Es handelt sich bei Peak (A) somit um einen Absorptionspeak. Peak (C) zeigt das Gegenteil von Peak (A): Der Q_{D1} -Peak bei (C) ist rein auf Laserintensitätsschwankungen oder andere Veränderungen wie Wasserdampfkonzentration zurückzuführen, da Q_{D2} die gleiche Veränderung zeigt wie Q_{D1} . Peak (B) ist entsprechend eine Überlagerung zwischen den bei (A) und (C) gezeigten Fällen.

Mit dieser Methode der Verwendung eines zweiten Detektors ist es daher nach Gleichung (3.1) möglich, ein bezüglich Laserintensitätsschwankungen normiertes Absorptionsspektrum A_{ref} zu erhalten⁵. Die zur Berechnung von A_{ref} benötigten Variablen sind in Abbildung 3.5 gezeigt. Im folgenden Teil der Arbeit ist aus Gründen der Vereinfachung mit A die Größe A_{ref} gemeint.

$$A_{ref} = \log_{10} Q_{D1,ref} = \log_{10} \frac{Q_{D1}}{Q_{D2}} = \log_{10} \frac{I_{M1D1} \cdot I_{M2D2}}{I_{M2D1} \cdot I_{M1D2}} = A \quad (3.1)$$

Zur Erstellung eines hyperspektralen Bildes wird an jedem Ort ein solches referenziertes Absorbanzspektrum A_{ref} aufgenommen. Für 64 Orte werden somit zunächst 64 zweikanalige (D1 und D2) Hintergrundspektren und anschließend 64 zweikanalige Probenspektren aufgenommen. Somit werden insgesamt $64 \cdot 2 + 64 \cdot 2 = 256$ Spektren für ein Bild mit 64 Pixeln generiert.

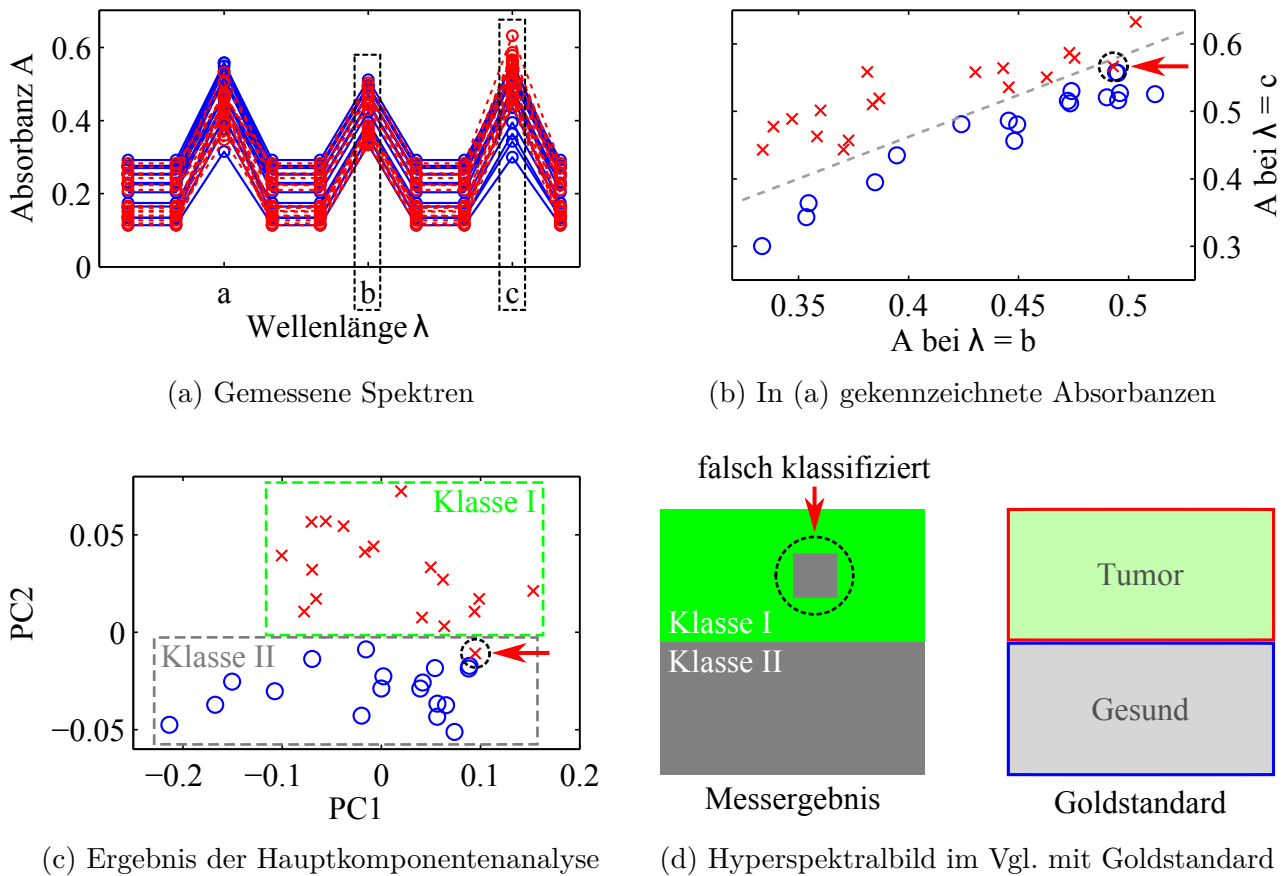


Abbildung 3.6: Beispielhafte Berechnung eines hyperspektralen Bildes aus Spektren, die an verschiedenen Orten aufgenommen wurden. In (a) sind beispielhaft 18 blaue Absorbanzspektren, z.B. von gesundem Gewebe, und 18 rote Absorbanzspektren, z.B. von Tumorgewebe, gezeigt. (b) zeigt das Streudiagramm der Absorbanzen bei den in (a) hervorgehobenen Wellenzahlen; eine räumlich Trennung der Werte von Tumor- und Normalspektren ist in (b) bis auf eine Ausnahme (mit rotem Pfeil markiert) möglich, jedoch nur unter Verwendung von zwei Dimensionen („b“ und „c“). (c) zeigt das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse (PCA, s. Abbildung 3.7) des Datensatzes aus (b); wie zu sehen ermöglicht die Analyse bis auf eine Ausnahme die Trennung der Werte unter Verwendung lediglich einer einzigen Dimension (PC2). (d) zeigt beispielhaft das „Messergebnis“ im Vergleich mit einem beispielhaften „Goldstandard“; es wurde dafür exemplarisch eine Gewebestruktur angenommen, bei der sich oben tumoröses und unten gesundes Gewebe befindet. Der in (c) falsch klassifizierte Wert äußert sich in der falschen Klassifikation eines Pixels, wie in (d) gezeigt. Grund für eine solche falsche Klassifikation sind z.B. Rauscheinflüsse (s. Abschnitt 4.2.9).

3.3.2 Bildgenerierung

In diesem Abschnitt wird beschrieben wie aus N verschiedenen nach Gleichung (3.1) berechneten Absorbanzspektren, die an N verschiedenen Orten aufgenommen wurden, ein hyperspektrales Bild entsteht. Jedem Pixel wird auf Grundlage des dazugehörigen Spektrums ein skalarer Wert zugeordnet, durch den ein Spektrum in eine von zwei Klassen eingeordnet wird (z.B. Klasse I „Gesund“ und Klasse II „Tumor“).

Abbildung 3.6 zeigt, wie aus Absorbanzspektren, die an verschiedenen Orten aufgenommen wurden, ein hyperspektrales Bild berechnet wird. In Abbildung 3.6a sind beispielhaft die an unterschiedlichen Orten aufgenommenen Spektren zwei verschiedener Gewebearten gezeigt, z.B. blau für gesundes, rot für tumoröses Gewebe. Die Spektren der beiden Gewebearten könnten mit dem Auge nicht voneinander unterschieden werden, wären sie hier nicht zu Darstellungszwecken farblich codiert. Ein Grund für spektrale Unterschiede trotz gleicher Gewebeart ist z.B. eine lokal variierende Wasserschichtdicke zwischen einer wässrigen Probe und dem ATR-Kristall. Darauf wird ausführlich in Abschnitt 4.1 eingegangen.

Beispielsweise aus Voruntersuchungen kann bekannt sein, dass die Absorbanzen bei zwei bestimmten Wellenlängen zur Gewebeunterscheidungen herangezogen werden können. Gut für eine Unterscheidung ist z.B. die Paarung einer zwischen den Gewebearten „stabiler“ und einer „veränderlichen Wellenlänge“. Mit „stabiler Wellenlänge“ ist gemeint, dass die Varianz der Absorbanzen bei dieser Wellenlänge innerhalb und auch zwischen den Gewebearten gering ist. Mit „zwischen den Gewebearten veränderlich“ ist gemeint, dass die Varianz der Absorbanzen zwischen den Gewebearten höher ist als innerhalb einer Gewebeart. Im Beispiel in Abbildung 3.6a wurden beispielhaft zwei solcher Wellenlängen modelliert, wobei „b“ stabil und „c“ veränderlich ist. Wellenlänge „a“ wurde beispielhaft so modelliert, dass die Varianz der Absorbanz innerhalb einer Gewebeart vergleichbar ist mit der Varianz zwischen den Gewebearten, weswegen diese Wellenlänge nicht für die Auswertung verwendet wird. In der Realität kann die Eigenschaft einer solchen Wellenlänge „a“ beispielsweise aus Voruntersuchungen bekannt sein; wie Abbildung 3.6a zeigt, ist eine solche Eigenschaft aus den Rohspektren schwer ersichtlich.

Das Streudiagramm der Absorbanz bei den Wellenlängen „b“ und „c“ in Abbildung 3.6b zeigt, dass bis auf eine Ausnahme die beiden Gewebearten „rot“ und „blau“ räumlich voneinander getrennt werden können. Es sind allerdings zwei Dimensionen („b“ und „c“) zur Beschreibung der Trennung notwendig. Zudem wären die beiden Gewebearten auch in dieser Darstellung nur

⁵Aufgrund der wellenlängenabhängigen Eindringtiefe der evaneszenten Welle d_p nach Gleichung (2.21) ist bei Verwendung von ATR auch die Absorptionsstärke wellenlängenabhängig. Das durch die Gleichungen (2.5) und (3.1) beschriebene Maß der Absorbanz kann daher entsprechend korrigiert werden [GH07, S. 327]. Inhalt der vorliegenden Arbeit ist jedoch der *relative* Vergleich unterschiedlicher Gewebespektren. Absolute quantitative Spektrometrie ist daher nicht notwendig. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die durch die Gleichungen (2.5) bzw. (3.1) beschriebene Absorbanz als Messgröße verwendet.

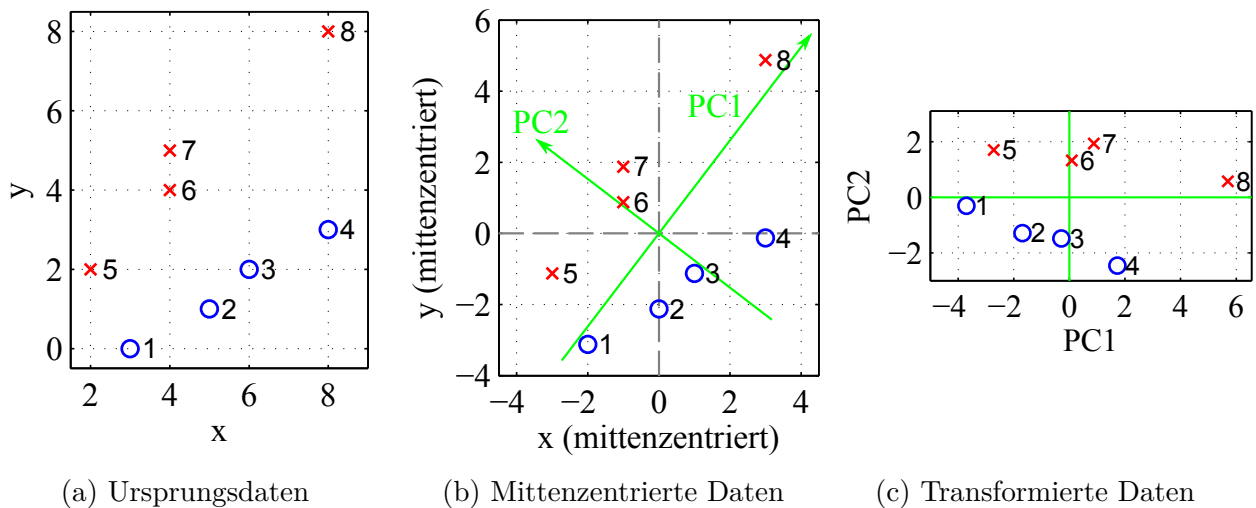


Abbildung 3.7: Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Vorgehen zur Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse. (a) zeigt die Ursprungsdaten der zwei Klassen „blau“ und „rot“. (b) zeigt die Mittenzentrierung der Daten aus (a) sowie die aus den Eigenwerten der Kovarianzmatrix berechneten Hauptkomponenten PC1 und PC2. PC1 zeigt dabei in Richtung der maximalen Varianz der Daten, PC2 steht senkrecht zu PC1 und schneidet den Ursprung. (c) zeigt die Werte unter Verwendung von PC1 und PC2 als neue Hauptachsen; in dieser Darstellung können die beiden Klassen in einer einzigen Dimension (hier PC2) durch Setzen des Schwellwerts bei $PC2 = 0$ unterschieden werden.

schwer voneinander zu unterscheiden, wären die gezeigten Werte nicht zu Darstellungszwecken farbig codiert.

Zur Gewebedifferenzierung könnten an dieser Stelle univariate Methoden (s. Abschnitt 2.6.2) verwendet werden. Beispielsweise könnten die Verhältnisse der Absorbanzen bei „c“ zu denen bei „b“ für eine Unterscheidung herangezogen werden. In Abschnitt 4.1 wird allerdings gezeigt, dass die Verwendung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, s. unten und Abschnitt 2.6.2) für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen in Bezug auf Gewebeunterscheidung effektiver ist. Durch Anwendung einer solchen Analyse, die im Folgenden kurz beschrieben wird, ist es möglich, die Werte des in Abbildung 3.6c gezeigten Streudiagramms unter Verwendung lediglich einer einzigen Dimension (in diesem Fall PC2) räumlich voneinander zu trennen. Dazu wird ein Schwellwert verwendet, der in diesem Beispiel $PC2 = 0$ beträgt und mithilfe dessen die beiden Gewebearten in eine von zwei Klassen („Tumor“ bzw. „Gesund“) eingeteilt werden. In Abbildung 3.6d ist schließlich exemplarisch ein hyperspektrales Bild gezeigt, das sich, unter Beachtung des Schwellwerts, aus der Zuordnung der PC2-Werte aus Abbildung 3.6c zu den jeweiligen (hier beispielhaften) Orten ergibt.

Das Vorgehen einer Hauptkomponentenanalyse ist in Abbildung 3.7 skizziert. Es werden beispielhaft die beiden Gewebearten „blau“ (Wertepaare 1 bis 4) und „rot“ (Wertepaare 5 bis 8) betrachtet. Um die Trennung dieser Gewebearten unter Verwendung lediglich einer Dimension zu beschreiben, d.h. um sie korrekt mithilfe eines Schwellwerts klassifizieren zu können, werden in der vorliegenden Arbeit folgende Schritte in Anlehnung an [Kes07, S. 25 ff.] durchgeführt:

1. Die in Abbildung 3.7a gezeigten acht Ausgangswerte werden zunächst mittenzentriert, d.h. es werden die Mittelwerte aus allen x- bzw. y-Werten gebildet und von den jeweiligen x- bzw. y-Werten abgezogen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.7b.
2. Aus den mittenzentrierten Werten werden die Eigenwerte der Kovarianzmatrix berechnet. Es werden so die Dimensionen maximaler Varianz bestimmt. Diese sind in Abbildung 3.7b grün eingezeichnet. Die erste Hauptkomponente PC1 (engl. „principal component“, PC) beschreibt grundsätzlich die maximale Varianz der Daten, die zweite Hauptkomponente PC2 steht senkrecht zu PC1 und schneidet den Koordinatenursprung. Bei den in Kapitel 4 gezeigten Auswertungen der Gewebeexperimente werden die Richtungen der Pfeile so bestimmt, dass sie der in Abbildung 3.7b gezeigten Darstellung entsprechen: PC1 zeigt vom Ursprung in Richtung des ersten Quadranten, PC2 zeigt vom Ursprung in Richtung des zweiten Quadranten.
3. Aus den Eigenwerten ergibt sich eine Transformationsmatrix, mit der die mittenzentrierten Werte multipliziert werden. Das Ergebnis dieser Hauptachsentransformation ist in Abbildung 3.7c gezeigt. Die beiden Klassen „blau“ und „rot“ können nun durch Setzen des Schwellwerts bei $PC2 = 0$ voneinander unterschieden werden.

Das skizzierte Vorgehen kann auch für höhere als die beispielhaft gezeigten zweidimensionalen Datensätze verwendet werden, wie in Abschnitt 4.2 gezeigt. Das beschriebene prinzipielle Vorgehen ändert sich dadurch nicht.

Die Hauptkomponentenanalyse wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus folgenden zwei Gründen verwendet:

- Aus Gründen der Datenreduktion: Die relevante spektrale Information wird auf eine einzelne Dimension abgebildet, in dem hier gezeigten Fall PC2. Dadurch ist eine Trennung der zwei Klassen durch Verwendung eines einzigen Schwellwerts möglich.
- Aufgrund der „Isolation“ von Störgrößen: In Abschnitt 4.1 wird gezeigt, dass die Verwendung der Hauptkomponentenanalyse bis zu einem gewissen Grad die Trennung von Messstörgrößen und tatsächlichen Gewebeunterschieden ermöglicht. Beispielsweise können bei einer Gewebeunterscheidung bis zu einem gewissen Grad wasserbedingte Störgrößen

ßen durch PC1 beschrieben werden, tatsächliche Gewebeunterschiede durch PC2. Unter Vernachlässigung von PC1 ist dadurch eine Gewebeunterscheidung möglich.

3.4 Potenzielle Strahlenbelastung des Patienten

In diesem Abschnitt wird die Strahlenbelastung des Patienten abgeschätzt, die bei einer möglichen späteren Verwendung des in den letzten Abschnitten beschriebenen Konzepts im Operationssaal auftreten kann.

In Bezug auf die Schädigung von Gewebe durch elektromagnetische Strahlung gibt es hinsichtlich eines gepulsten Lasers zwei Betrachtungsweisen, auf die im Folgenden eingegangen wird [Eur06, S. L 114/58]:

1. Die Schädigung durch kurzzeitigen, hohen Energieeintrag während eines Einzelpulses.
2. Die Schädigung durch die über den gesamten Zeitraum einer Messung kumulierte Strahlenbelastung aufgrund wiederholter Exposition.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete QCL-System emittiert Pulse mit einer maximalen Pulsspitzenleistung von ca. 0,8 W und Pulslängen von maximal $t_p = 500$ ns bei einem maximalen Puls-Pausen-Verhältnis von 5 %, d.h. einer Pulswiederholrate von 100 kHz (s. Abschnitt 3.6.1) [Day13b].

Für einen einzelnen Puls dieser Pulslänge im mittleren Infrarotbereich nennt die EU-Richtlinie 2006/25/EG zum Schutz von Arbeitnehmern in Bezug auf künstliche optische Strahlung folgende maximal erlaubte Energie pro Fläche [Eur06, S. L 114/54]:

$$H_{p,max} = 5,6 \times 10^3 \cdot (t_p)^{0,25} \text{ J m}^{-2} = 5,6 \times 10^3 \cdot (500 \times 10^{-9} \text{ s})^{0,25} \text{ J m}^{-2} \approx 150 \text{ J m}^{-2} \quad (3.2)$$

Aufgrund der in Abschnitt 3.7.1 bestimmten Ortsauflösung von ca. 1 mm wird an dieser Stelle von einem Laserstrahldurchmesser im Fokus von etwa $d_f = 0,5$ mm ausgegangen. Die als kreisförmig angenommene bestrahlte Fläche F_b wird für diesen Fall wie folgt bestimmt [BSMM06, S. 143]:

$$F_b = \pi \left(\frac{d_f}{2} \right)^2 = \pi \left(\frac{0,5 \text{ mm}}{2} \right)^2 \approx 0,20 \text{ mm}^2 = 2 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \quad (3.3)$$

Für einen Rechteckpuls mit Pulslänge $t_p = 500$ ns und einer Pulsspitzenleistung von $P_{p,max} = 0,8$ W lässt sich daher die Energie pro Fläche H_p nach Gleichung (3.4) berechnen [HMS04,

S. 50]:

$$H_p = \frac{P_{p,max} \cdot t_p}{F_b} = \frac{0,8 \text{ W} \cdot 500 \times 10^{-9} \text{ s}}{2 \times 10^{-7} \text{ m}^2} \text{ J m}^{-2} = 2 \text{ J m}^{-2} < H_{p,max} = 150 \text{ J m}^{-2} \quad (3.4)$$

Der Grenzwert $H_{p,max}$ für kurzzeitigen, hohen Energieeintrag in das Gewebe während eines Einzelpulses wird für den vorliegenden Fall somit erfüllt.

Für den zweiten Fall der wiederholten Exposition bei gepulster Strahlung über einen längeren Zeitraum werden folgende zwei Grenzwerte betrachtet [Eur06, S. L 114 58] [BGV07, S. 46]:

1. Der Grenzwert $H_{p,max,C5}$, der sich aus dem bereits verwendeten Grenzwert $H_{p,max}$, multipliziert mit einem Korrekturfaktor C_5 ergibt.
2. Der Grenzwert $I_{k,max}$, der sich aus der auf das Gewebe einwirkenden mittleren Strahlungsleistung über den gesamten Zeitraum der Messung ergibt.

$H_{p,max,C5}$ berechnet sich nach Gleichung (3.5), wobei der Wert N im mittleren Infrarotbereich der Anzahl der Pulse entspricht, die im Zeitraum von maximal 10s emittiert werden [BGV07, S. 46 f.]. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit jeder gemessene Ort des Gewebes über einen Zeitraum von mindestens 10s bestrahlt wird (s. Abschnitt 3.6.1), wird diese Dauer verwendet. Für die genannte Pulswiederholrate von 100 kHz ergeben sich somit $N = 10 \text{ s} \cdot 100 \text{ kHz} = 1 \times 10^6$ Pulse.

$$H_{p,max,C5} = H_{p,max} \cdot C_5 = H_{p,max} \cdot N^{-\frac{1}{4}} = 150 \text{ J m}^{-2} \cdot (1 \times 10^6 \text{ Pulse})^{-\frac{1}{4}} \approx 4,7 \text{ J m}^{-2} \quad (3.5)$$

Auch dieser Grenzwert $H_{p,max,C5}$ wird somit erfüllt, da $H_{p,max,C5}$ größer ist als der bereits berechnete Wert $H_p = 2 \text{ J m}^{-2}$.

Der dritte Grenzwert $I_{k,max}$ der mittleren Strahlungsleistung auf das Gewebe über den gesamten Zeitraum der Messung ergibt sich für Bestrahlungszeiten zwischen 10s und mehreren Stunden zu $I_{k,max} = 1000 \text{ W m}^{-2}$ [Eur06, S. L 114/55]. Die mittlere Strahlungsleistung P_k lässt sich bei einer Pulsspitzenleistung von 0,8 W und einem Puls-Pausen-Verhältnis von 5% für Rechteckpulse wie folgt berechnen:

$$P_k = 0,8 \text{ W} \cdot 0,05 = 0,04 \text{ W} \quad (3.6)$$

Daraus ergibt sich unter Verwendung der in Gleichung (3.3) berechneten Fläche folgende kontinuierliche, mittlere Strahlungsintensität I_k :

$$I_k = \frac{P_k}{F_b} = \frac{0,04 \text{ W}}{2 \times 10^{-7} \text{ m}^2} = 200 \times 10^3 \text{ W m}^{-2} > I_{k,max} = 1 \times 10^3 \text{ W m}^{-2} \quad (3.7)$$

Der Grenzwert $I_{k,max}$ wird für den vorliegenden Fall somit überschritten. Folgende Aspekte sprechen allerdings dafür, dass dieser Grenzwert dem Konzept der vorliegenden Arbeit nicht entgegensteht:

Die Strahlung wird, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, auf ungefähr $P_{p,red} = 10 \text{ mW}$ Puls-spitzenleistung pro Messkanal abgeschwächt. Die mittlere Strahlungsintensität $I_{k,red}$ bei einem Puls-Pausen-Verhältnis von 5 % berechnet sich für diesen Fall nach folgender Gleichung:

$$I_{k,red} = \frac{P_{p,red} \cdot 0,05}{F_b} = \frac{0,01 \text{ W} \cdot 0,05}{2 \times 10^{-7} \text{ m}^2} = 2,5 \times 10^3 \text{ W m}^{-2} > I_{k,max} = 1 \times 10^3 \text{ W m}^{-2} \quad (3.8)$$

Durch die Abschwächung wird der Grenzwert nicht erreicht. Allerdings trifft aufgrund der Verwendung von ATR im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Strahlung nicht direkt auf das Gewebe, sondern die Wechselwirkung findet über die evaneszente Welle statt. Bei [Ste73, Jon98] wird der Emissionsgrad der menschlichen Haut im Spektralbereich zwischen 3 und 12 μm mit ca. 0,98 angegeben. Haut entspricht in diesem Spektralbereich daher näherungsweise einem schwarzen Strahler und absorbiert somit nach dem Kirchhoff'schen Gesetz auftreffende Strahlung der entsprechenden Wellenlänge im Prinzip vollständig [HMS04, S. 214]. Die in der EU-Richtlinie angegebenen Grenzwerte für den mittleren Infrarotbereich können folglich als maximale Energiewerte gesehen werden, die von der Haut absorbiert werden dürfen. Im Falle von Einfachreflexions-ATR wird bei Gewebemessungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit i. d. R. nicht mehr als 10 % der Strahlung vom Gewebe absorbiert (s. Abschnitt 4.1.5)⁶. Der in Gleichung (3.8) berechnete Wert reduziert sich daher nach folgender Gleichung:

$$I_{k,red,ATR} = I_{k,red} \cdot 0,1 = 0,25 \times 10^3 \text{ W m}^{-2} < I_{k,max} = 1 \times 10^3 \text{ W m}^{-2} \quad (3.9)$$

Somit wird auch der Grenzwert $I_{k,max}$ erfüllt⁷.

⁶Berechnung aus den dort gezeigten Absorbanzwerten.

⁷Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die in der Arbeitsschutzrichtlinie genannten Daten besonders vorsichtig gewählte Grenzwerte darstellen, die unterhalb der Werte für Gewebeschädigung liegen. Beispielsweise verwendeten [BDAM10] bei in vivo-Raman-Spektroskopie eine Laserleistung von etwa 100 mW über einen Zeitraum von 5 s, wenn auch in einem anderen Spektralbereich.

3.5 Unterscheidungsmerkmale des Lösungskonzepts gegenüber dem Stand der Forschung und dem Stand der Technik

Das in den letzten Abschnitten beschriebene Konzept unterscheidet sich von den im Stand der Forschung (1.4) beschriebenen Untersuchungen durch die Summe der folgend genannten Eigenschaften:

- Durch Verwendung von abgeschwächter Totalreflexion (ATR) und der Messung in einem spektralen Fenster mit reduziertem Wassereinfluss (s. Abschnitt 3.2.1) können native, ungetrocknete Proben hyperspektral gemessen werden.
- Die Bildgröße von $8 \times 8 \text{ mm}^2$ ermöglicht einen Überblick über das zu entfernende Gewebe, die Auflösung von etwa 1 mm liegt im Bereich zwischen 0,1 und 1 mm, in dessen Größenordnung ein Chirurg nach [KSSK10, SSK⁺11] Gewebe entfernt (s. Abschnitt 3.1).
- Die Realisierung eines QCL- statt eines FTIR-Spektrometers bietet folgende Vorteile (vgl. Abschnitt 3.2.2):
 - Aufgrund geringerer Größe und geringeren Gewichts können QCL-Spektrometer potenziell als handgeführte und mobile Geräte verwendet werden.
 - Die Bedienbarkeit wird aufgrund des Wegfalls stickstoffgekühlter Detektoren sowie einer schnelleren Verfügbarkeit (s. Abschnitt 3.2.2) erhöht.

Im Vergleich zu dem im Stand der Technik (1.3.1) beschriebenen Schnellschnittverfahren zielt das Konzept der vorliegenden Arbeit auf eine intraoperative Unterscheidung am lebenden Gewebe. Dadurch könnten Sicherheitsabstände im gesunden Gewebe verringert werden. Gegenüber klassischen Bildgebungsverfahren wie CT, MRT oder Sonographie in der intraoperativen Anwendung wäre die Realisierung des Ansatzes kostengünstiger (CT, MRT), weniger strahlenbelastend (CT) und höher auflösend (Sonographie). Für das Verfahren wären zudem keine Fluoreszenzmarker notwendig und es wäre, anders als z.B. 5-ALA, nach den Tabellen 1.1 und 1.2 für eine Vielzahl von Tumoren einsetzbar.

In Bezug auf den an dieser Stelle getätigten Vergleich zum Stand der Technik sei hier noch einmal betont, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine erste Machbarkeitsstudie handelt, im Rahmen derer das in den letzten Abschnitten beschriebene Verfahren auf seine prinzipielle Eignung für einen intraoperativen Einsatz untersucht wird. Das Konzept beinhaltet diesbezüglich Elemente (z.B. der verwendete Quantenkaskadenlaser), die erst mit entsprechendem technologischen Fortschritt für den gedachten Einsatzort Operationssaal geeignet sein werden.

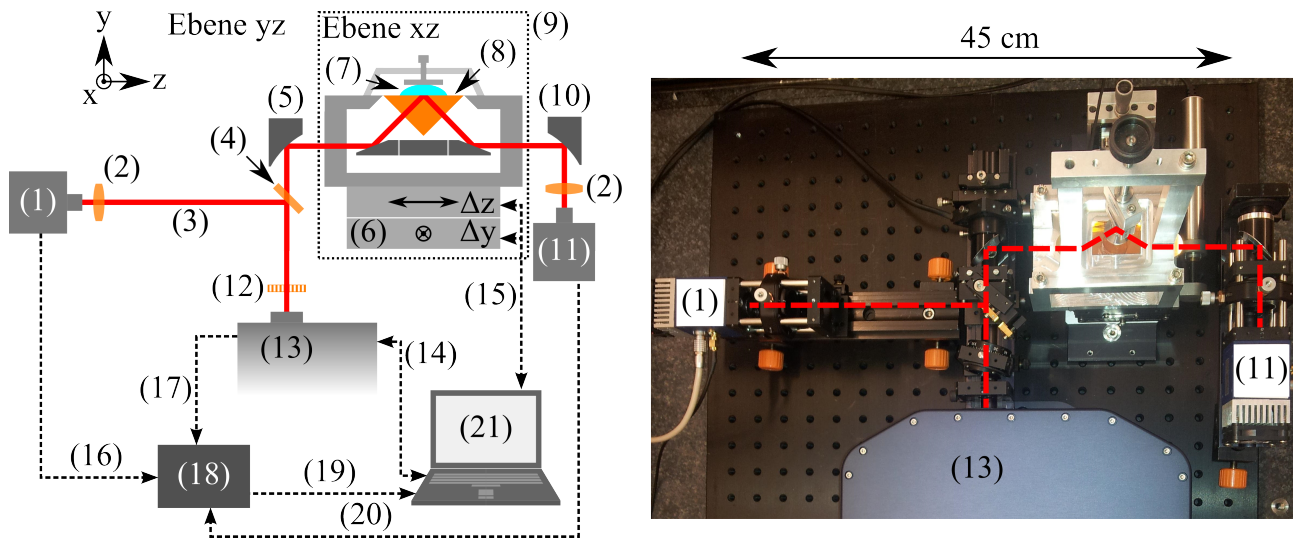


Abbildung 3.8: Übersicht über den Laboraufbau: (1) Detektoreinheit D1 zum Messen von Laserintensitätsschwankungen (Referenzmessung), (2) Linse zur Fokussierung der Strahlung auf den Detektor, (3) Laserstrahlung, (4) Strahlteiler, (5) Fokussierspiegel, (6) Kreuztisch, (7) Probe, (8) ATR-Kristall mit darüber befindlichem Anpressmechanismus, (9) ATR-Einheit, (10) Kollimationsspiegel, (11) Detektoreinheit D2 zum Messen der Probenabsorption, (12) Polarisator zum Abschwächen der Laserstrahlung, (13) Quantenkaskadenlaser (QCL), (14) Kommunikation QCL/Steuerungsrechner, (15) Kommunikation Kreuztisch/Steuerungsrechner, (16) Übertragung des Referenzsignals an Datenerfassungskarte, (17) Lasertrigger zur Steuerung der Datenaufnahme, (18) Datenerfassungskarte, (19) Messdatenübertragung an Steuerungsrechner, (20) Übertragung des Probensignals an Datenerfassungskarte, (21) Steuerungsrechner.

3.6 Laboraufbau

Abbildung 3.8 zeigt den realisierten Laboraufbau, der auf dem in den letzten Abschnitten beschriebenen Konzept basiert. Im Folgenden wird auf die einzelnen Bestandteile eingegangen.

3.6.1 Verwendete Komponenten

Verwendeter Quantenkaskadenlaser

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete QCL-System der Modellbezeichnung *MIRcat-1300* wurde von der Firma Daylight Solutions Inc. (San Diego, USA) im Jahr 2013 hergestellt. Es gehört somit der ersten Generation derartiger breit durchstimmbarer QCL-

Systeme an [Day13b]. Das System beinhaltet drei gepulste Laserkavitäten, die maximale Pulsspitzenleistung der stärksten Kavität liegt bei ca. 800 mW.

Die Kavitäten können mithilfe eines externen Resonators (s. Abbildung 2.6) von ca. 1680 cm^{-1} bis 970 cm^{-1} ($5,9\text{ }\mu\text{m}$ bis $10,3\text{ }\mu\text{m}$) innerhalb von näherungsweise 16,5 s bei maximaler Geschwindigkeit durchgestimmt werden. Das Rückstellen und Initialisieren des Beugungsgitters benötigt ebenfalls etwa 16,5 s. Das Anfahren des nächsten Messortes mit dem in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Kreuztisch benötigt näherungsweise 2,5 s und geschieht parallel zum Rückstellen des Beugungsgitters. Der limitierende Zeitfaktor der Messung ist somit die Durchstimmgeschwindigkeit des Lasers. Für eine Proben- bzw. Hintergrundmessung an 64 Orten benötigt das System somit $(16,5\text{ s} + 16,5\text{ s}) \cdot 64 \approx 35\text{ min}$. Die in Abschnitt 3.1 geforderte Messdauer von mehreren Sekunden wird mit dieser ersten Generation breit durchstimmbarer QCLs somit nicht erfüllt. Neue Modelle ermöglichen allerdings bereits Durchstimmgeschwindigkeiten von $25\text{ cm}^{-1}\text{ ms}^{-1}$ bei einer Pulswiederholrate von bis zu 3 MHz [Blo14, YKLB15] und somit eine Scandauer von $64 \cdot (1680\text{ cm}^{-1} - 970\text{ cm}^{-1}) / 25\text{ cm}^{-1}\text{ ms}^{-1} \approx 1,8\text{ s}$ statt 35 min. Durch Verwendung neu entwickelter QCLs scheint eine zukünftige Messdauer von mehreren Sekunden daher möglich.

Die Strahlen der einzelnen Kavitäten werden nacheinander mithilfe eines Spiegelsystems auf demselben optischen Weg emittiert. Die Strahllagestabilität beträgt dabei laut Hersteller $< 2\text{ mrad}$ für einen Durchstimmbereich von 100 cm^{-1} , die spektrale Linienbreite $\leq 1\text{ cm}^{-1}$ (Halbwertsbreite), die Strahldivergenz $< 5\text{ mrad}$ (Vollwinkel, $1/e$ -Intensität), die Puls-zu-Puls-Leistungsschwankung $< 5\%$, die Langzeitleistungsschwankung (1 Stunde) $< 2\%$ [Day13b, Day13a], die maximale Pulsbreite 500 ns, die maximale Pulswiederholrate 100 kHz und das maximale Puls-Pausen-Verhältnis somit $100\text{ kHz} \cdot 500\text{ ns} = 5\%$ [Day13b]. Die genannte Pulsbreite und Pulswiederholrate wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet. Der Laser ist laut Hersteller linear im Verhältnis 100 : 1 polarisiert. Die Abmessungen des Systems liegen bei $45,5 \times 24,9 \times 16\text{ cm}^3$, das Gewicht bei ca. 20 kg. Die Kavitäten werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Peltier-Elemente auf eine einstellbare konstante Betriebstemperatur von 17°C gekühlt. Der Vorgang dafür dauert nach dem Anschalten der Kühlung bei Raumtemperatur etwa 30 s.

ATR-Scanaufbau

Der verwendete ATR-Kristall (PS702, Thorlabs GmbH, Dachau, D.) hat die Form eines rechtwinkligen Prismas und besteht aus Zinkselenid (ZnSe). ZnSe wird aufgrund der in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Vorteile verwendet (Kosten, günstiger Brechungsindex). Die Kristallgrundfläche beträgt $25 \times 35,4\text{ mm}^2$, die Höhe 17,7 mm.

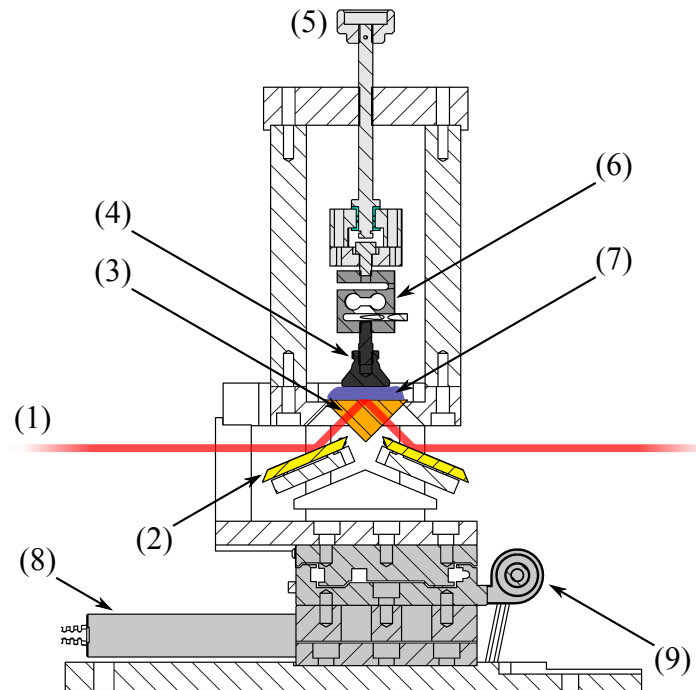


Abbildung 3.9: Schnitt durch den ATR-Scanaufbau. (1) Strahlung, (2) Spiegel, (3) ATR-Kristall, (4) Gelenkteller, (5) Rändelschraube zum Einstellen des Anpressdrucks, (6) Kraftsensor, (7) Probe, (8) Motor für Bewegung in z-Richtung, (9) Motor für Bewegung in y-Richtung.

Der Kristall ist, wie in Abbildung 3.9 gezeigt, mit einer Kristallhalterung aus Aluminium verklebt und befindet sich in einem Becken, das für eine Nachstellung von *in vivo*-Bedingungen (s. Abschnitt 3.1) mit Flüssigkeit gefüllt werden kann. Die Kristallfläche steht dabei im Vergleich zur Becken Grundfläche leicht hervor, so dass auch Proben vermessen werden können, die größer sind als der Kristall.

Die Laserstrahlung wird von den in Abbildung 3.9 gezeigten goldbeschichteten Planspiegeln (32-086, Edmund Optics GmbH, Karlsruhe, D.) auf die Innenseite der Kristallgrundfläche reflektiert, wo es zu Totalreflexion in einem Winkel von ca. 45° kommt.

Über dem Kristall befindet sich eine Anpressvorrichtung, bestehend aus einem Schraubmechanismus zum Aufbringen der Anpresskraft sowie einem Kraftsensor (KD24S 50, ME-Meßsysteme GmbH, Hennigsdorf, D.) zum Messen der Kraft. Messbereich und Genauigkeit des Kraftsensors sind vom Hersteller mit ± 50 N und 0,1 % angegeben [MEM14]; die Messwerte werden von einem Messverstärker verarbeitet und auf einer Digitalanzeige ausgegeben (GSV-2FSD-DI, ME-Meßsysteme GmbH).

Die Gewindestange des Anpressmechanismus wird am oberen Ende über eine Rändelmutter (06010-206, Norelem Normelemente KG, Markgröningen, D.) bewegt, wodurch der Anpressdruck stufenlos eingestellt werden kann. Unterhalb des Kraftsensors befindet sich als Schnittstelle zur Probe ein Gelenkteller aus Edelstahl (07144-306, Norelem Normelemente KG), der

ein gleichmäßiges Anpressen der Probe ermöglicht. Die Rotationsbewegung der Gewindestange ist durch ein Gleitlager (GFM-0608-04, Igus GmbH, Köln, D.) von der Translationsbewegung entkoppelt, so dass auf die Probe keine Rotations-, sondern nur eine Translationskraft ausgeübt wird.

Die Probe wird bei einem Scanvorgang zusammen mit dem ATR-Kristall und der Anpressvorrichtung bewegt, der Strahlengang bleibt unverändert. Der dafür verwendete Kreuztisch besteht aus zwei aufeinander montierten Lineartischen (M-423, Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, D.) sowie zwei Aktoren (CONEX-TRA25CC, Newport Spectra-Physics GmbH). Die Aktoren bestehen jeweils aus Servomotor, Spindel und Steuerung und ergeben einen Verfahrweg von 25 mm in beide Richtungen bei einer Höchstgeschwindigkeit von $0,4 \text{ mm s}^{-1}$ laut Datenblatt [New13]. Die Positionswiederholgenauigkeit wird dort mit $\leq 3 \mu\text{m}$ angegeben. Der Vorteil dieser Kreuztischkonfiguration ist, dass sie aufgrund der vergleichsweise kompakten Größe in die Probenkammer des in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen FTIR-Spektrometers passt. Dies war bei der Auswahl wichtig, um das QCL-Spektrometer mit einem kommerziellen FTIR-Spektrometer vergleichen zu können (s. Abschnitt 3.7.1).

Im letzten Unterabschnitt wurde der limitierende Einfluss der langsamen Laserdurchstimmgeschwindigkeit beschrieben. Aus diesem Grund wurde bei dem Laboraufbau kein Augenmerk auf die Entwicklung eines entsprechend schnellen Scansystems gelegt. Es wird davon ausgegangen, dass bei der zukünftigen Verwendung schnell durchstimmbarer Laser (s. letzter Unterabschnitt) ein schnelleres Scansystem durch entsprechenden Entwicklungsaufwand zu realisieren ist. Abgesehen davon ist für den Fall technischen Fortschritts in Bezug auf ausreichend stabile Laser zukünftig u. U. auch ein Snapshot-System (s. Abschnitt 2.6.1) denkbar, das ein Scansystem überflüssig macht.

Optischer Strahlengang

Abbildung 3.8 zeigt diverse optische Elemente zur Formung des Strahlengangs, auf die in diesem Abschnitt kurz eingegangen wird.

Der Polarisator aus ZnSe (WP25H-Z, Thorlabs GmbH) direkt nach dem Austritt der Strahlung aus dem QCL-System ermöglicht die Abschwächung der linear polarisierten Laserstrahlung. Dies ist notwendig, da die Laserintensität oberhalb des Linearitätsbereichs der verwendeten Detektoren liegt (s. nächster Unterabschnitt). Der Polarisator ist schräg gestellt, um Rückreflexionen in die Laserkavität und damit verbundene Instabilitäten oder Schädigungen zu vermeiden.

Der beschichtete Strahlteiler aus ZnSe (BSW710, Thorlabs GmbH) wird verwendet, um die Strahlung in einen Proben- und einen Referenzstrahlengang aufzuteilen. Der zur Fokussierung

der Strahlung verwendete Parabolspiegel (47-099, Edmund Optics GmbH) ist aluminiumbeschichtet und hat eine Fokusslänge von 101,6 mm. Zur Reflexion der Strahlung auf den Messbereich bzw. zur Reflexion auf den kollimierenden Parabolspiegel nach Probenkontakt werden die bereits im vorherigen Abschnitt genannten goldbeschichteten Planspiegel (32-086, Edmund Optics GmbH) verwendet. Bei dem kollimierenden Parabolspiegel handelt es sich um das gleiche Modell wie der fokussierende Parabolspiegel.

Die Fokussierung der Strahlung auf die Detektoren erfolgt mit jeweils einer ZnSe-Linse (LA7542-F, Thorlabs GmbH) mit Fokusslänge 25,4 mm.

Strahlungsdetektoren

Verwendete Strahlungsdetektoren

Als Strahlungsdetektoren werden zwei MCT-Photodioden (PVMI-2TE-10.6, Vigo System S.A., Ozarow Mazowiecki, Polen) verwendet. Mit jedem Detektor fest verbunden ist jeweils ein Vorverstärker (MIPAC-F-10, Vigo System S.A.) mit einer elektrischen Bandbreite Δf von 10 Hz bis 10 MHz. Die aktive Detektorfläche beträgt $1 \times 1 \text{ mm}^2$. Diese Größe ist ein Kompromiss zwischen geringerem Rauschen bei kleiner Fläche und einfacher Fokussierung bei großer Fläche.

Die Detektoren sind zweistufig thermoelektrisch auf eine Temperatur von ca. 230 K gekühlt (TE-Kühler-Steuerung STCC-04, Vigo System S.A.). Die spezifische Detektivität der Detektoren beträgt in dieser Konfiguration nach Herstellerangaben $D^* > 6 \times 10^8 \text{ cm Hz}^{1/2} \text{ W}^{-1}$ für den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Spektralbereich. Die Linearitätsgrenze liegt bei etwa 10 mW mm^{-2} . Der Laserstrahl wird daher so weit abgeschwächt, dass die auf die Detektoren treffende maximale Leistung jeweils 10 mW nicht übersteigt.

Vergleich unterschiedlicher Detektoren in Bezug auf Rauschen

Im Folgenden werden die Signal-Rausch-Verhältnisse (englisch „signal-to-noise ratio“, SNR) eines stickstoff- und zweier thermoelektrisch (TE) gekühlter Detektoren verglichen. In Verbindung mit den in Abschnitt 3.7.3 beschriebenen Experimenten zeigt die Rechnung, dass die höhere Sensitivität stickstoffgekühlter Detektoren für die vorliegende Arbeit nicht notwendig ist.

Die Anzahl der während eines Laserpulses emittierten Photonen wird nach Gleichung (3.10) berechnet. Die verwendeten Parameter sind die abgeschwächte Laserleistung $P_{\text{Laser}} = 10 \text{ mW}$, die Pulslänge $t_p = 500 \text{ ns}$, die mittlere Wellenlänge $\lambda = 8 \mu\text{m}$ (1250 cm^{-1}), die Planck-Konstante h , und die Lichtgeschwindigkeit c [EMV10, S. 5].

$$N_{p,\text{Laser}} = \frac{P_{\text{Laser}} \cdot t_p \cdot \lambda}{h \cdot c} = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ W} \cdot 500 \times 10^{-9} \text{ s} \cdot 8 \times 10^{-6} \text{ m}}{6,63 \times 10^{-34} \text{ J s} \cdot 3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}} \approx 2,011 \times 10^{11} \quad (3.10)$$

Aus dieser Größe berechnet sich die Anzahl der durch die Laserphotonen freigesetzten Elektronen im Detektormaterial nach Gleichung 3.11. Dabei bezeichnet η_q den material- und temperaturabhängigen Quantenwirkungsgrad. Bei [Won09] wird dieser für MCT-Detektoren bei einer Temperatur von 245 K mit $\eta_q = 0,6$ angegeben.

$$N_{e,Laser} = \eta_q N_{p,Laser} = 0,6 \cdot 2,011 \times 10^{11} \approx 1,207 \times 10^{11}. \quad (3.11)$$

Neben den Laserphotonen treffen auch vom Hintergrund abgestrahlte Photonen auf den Detektor. Die Leistung P_H dieser Hintergrundphotonen berechnet sich nach Gleichung (3.12) [HMS04, S. 436, S. 440, S. 483]. Dabei bezeichnet F_d die Detektorfläche, Ω den Raumwinkel, und das Integral die Integration der spektralen Strahldichte nach Planck. Es gilt $c_1 = 2hc^2$ und $c_2 = hc/c_3$ mit c_3 als Boltzmann-Konstante. Für T wird die Umgebungsraumtemperatur 300 K verwendet, Ω_0 bezeichnet den vollen Raumwinkel 4π . Die verwendeten Detektoren haben einen Akzeptanzwinkel von 180° , der Raumwinkel beträgt somit $\Omega = 2\pi$. Die Integrationsgrenzen $\lambda_1 = 2 \mu\text{m}$ bzw. $\lambda_2 = 13 \mu\text{m}$ sind die ungefähren Grenzen des spektralen Sensitivitätsbereichs der Detektoren.

$$\begin{aligned} P_H &= F_d \cdot \Omega \cdot \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{c_1}{\lambda^5} \frac{1}{e^{c_2/(\lambda T)} - 1} \frac{1}{\Omega_0} d\lambda = \\ &= 1 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot 2\pi \cdot \int_{2 \mu\text{m}}^{13 \mu\text{m}} \frac{1,191 \times 10^{-16} \text{ W m}^2}{\lambda^5} \frac{1}{e^{\frac{1,439 \times 10^{-2} \text{ m K}}{\lambda \cdot 300 \text{ K}}} - 1} \frac{1}{4\pi} d\lambda = \\ &\approx 3,38 \times 10^{-5} \text{ W} \end{aligned} \quad (3.12)$$

Es gilt somit für den gezeigten Fall $P_H \ll P_{Laser} = 1 \times 10^{-2} \text{ W}$, weswegen Hintergrundstrahlung für die folgende Berechnung vernachlässigt wird⁸.

Für den Vergleich unterschiedlicher Detektoren werden hier die zwei zentralen Rauscharten *Photonenrauschen* und *Dunkelstromrauschen* betrachtet.

Die Anzahl der durch Photonengeräuschen entstehenden Rauschelektronen im Detektor berechnet sich nach [EMV10] mit folgender Formel:

$$N_{R,e,Laser} = \sqrt{N_{e,Laser}} = \sqrt{\eta_q N_{p,Laser}} = \sqrt{0,6 \cdot 2,011 \times 10^{11}} \approx 3,47 \times 10^5 \quad (3.13)$$

Zur Berechnung der Anzahl der im Detektormaterial statistisch entstehenden Dunkelstromelektronen wird die oben genannte spezifische Detektivität D^* verwendet. Daraus lässt sich nach

⁸Bei Verwendung stickstoffgekühlter Detektoren und der damit verbundenen, im Folgenden gezeigten, weiteren Abschwächung der Laserleistung aufgrund einer niedrigeren Linearitätsgrenze, wäre die hier berechnete Hintergrundleistung u. U. nicht zu vernachlässigen. Stickstoffgekühlte Detektoren verfügen aber i. d. R. über Kaltblenden, so dass die auf den Detektor treffende Hintergrundstrahlung in diesem Fall deutlich geringer wäre als der hier berechnete Wert.

Gleichung (3.14) die Größe NEP (engl. „noise equivalent power“) berechnen [Boy83, S. 114] [DAJ01, S. 22] [HBG05, S. 268]. Diese beschreibt die optische Leistung, die auf den Detektor treffen muss, damit für das Signal-Rausch-Verhältnis $SNR = 1$ gilt [Dem11, S. 129]. Der Wert Δf bezeichnet die im letzten Paragraphen genannte elektrische Bandbreite.

$$NEP = \frac{\sqrt{F_d \cdot \Delta f}}{D^*} = \frac{\sqrt{1 \times 10^{-6} \text{ m} \cdot 1 \times 10^7 \text{ Hz}}}{6 \times 10^8 \text{ cm Hz}^{1/2} \text{ W}^{-1} \cdot 0,01 \text{ m cm}^{-1}} \approx 5,27 \times 10^{-7} \text{ W} \quad (3.14)$$

Analog zu Gleichung (3.10) berechnet sich daraus nach Gleichung (3.15) die Anzahl der Photonen $N_{p,Dunkel}$, die nötig sind, damit ein SNR von Eins erreicht wird:

$$N_{p,Dunkel} = \frac{NEP \cdot t_p \cdot \lambda}{h \cdot c} = \frac{5,27 \times 10^{-7} \text{ W} \cdot 500 \times 10^{-9} \text{ s} \cdot 8 \times 10^{-6} \text{ m}}{6,63 \times 10^{-34} \text{ J s} \cdot 3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}} \approx 1,06 \times 10^7 \quad (3.15)$$

Die Anzahl der Dunkelstromelektronen beträgt somit:

$$N_{e,Dunkel} = \eta_q N_{p,Dunkel} = 0,6 \cdot 1,06 \times 10^7 = 6,36 \times 10^6 \quad (3.16)$$

Es gilt daher für den gezeigten Fall $N_{e,Dunkel} \gg N_{R,e,Laser} = 3,47 \times 10^5$. Der vorliegende Fall ist somit *dunkelstromlimitiert*.

Auf Grundlage der bisherigen Ausführungen lässt sich nach [EMV10, S. 7] das Signal-Rausch-Verhältnis für die bisher betrachtete Konfiguration wie folgt berechnen:

$$SNR = \frac{N_{e,Laser}}{\sqrt{N_{R,e,Laser}^2 + N_{e,Dunkel}^2}} = \frac{1,207 \times 10^{11}}{\sqrt{(3,47 \times 10^5)^2 + (6,36 \times 10^6)^2}} \approx 1,9 \times 10^4 \quad (3.17)$$

Analog zu dem bisher berechneten Fall zeigt Abbildung 3.10 das laserintensitätsabhängige Signal-Rausch-Verhältnis auch für zwei weitere Detektorkonfigurationen: Einen stickstoffgekühlten (77 K) MCT-Detektor (z.B. P9697-02, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) und einen ebenfalls zweistufig thermoelektrisch gekühlten MCT-Detektor (PVM-2TE-10.6, Vigo System S.A.). Letzterer weist im Vergleich zu dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Detektortyp eine geringere spezifische Detektivität mit $D^* > 2 \times 10^8 \text{ cm Hz}^{1/2} \text{ W}^{-1}$ auf, dafür aber einen Linearitätsbereich bis etwa 100 mW mm^{-2} . Der bei 77 K betriebene Detektor hat nach Herstellerangaben eine spezifische Detektivität von etwa $D^* = 3 \times 10^{10} \text{ cm Hz}^{1/2} \text{ W}^{-1}$ und einen Linearitätsbereich bis etwa 1 mW mm^{-2} .

Aufgrund der Abhängigkeit zwischen Detektivität und Linearitätsbereich [Won09] bedeutet ein höheres D^* nicht zwangsläufig ein höheres SNR, wie in Abbildung 3.10 gezeigt. Für die genannten Werte ermöglicht der stickstoffgekühlte Detektor das höchste Signal-Rausch-Verhältnis, der

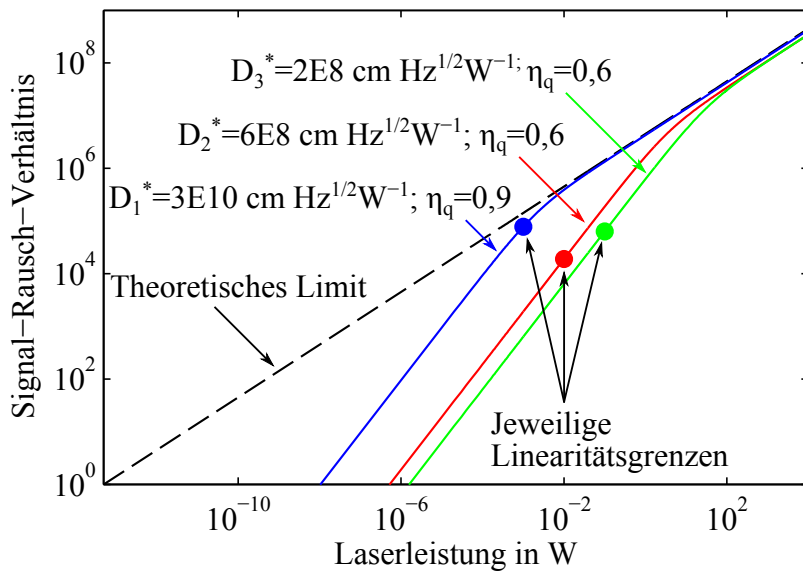


Abbildung 3.10: Signal-Rausch-Verhältnisse verschiedener möglicher Kombinationen von spezifischer Detektivität D^* und Linearitätsgrenzen. D_1^* ist die Detektivität eines stickstoffgekühlten Detektors, D_2^* und D_3^* die Detektivität zwei verschiedener thermoelektrisch gekühlter Detektoren. Letztere unterscheiden sich in ihrer Bauweise. Der Quantenwirkungsgrad η_q ist temperaturabhängig und beträgt für MCT nach [Won09] $\eta_q = 0,6$ bei einer Detektortemperatur von 245 K und $\eta_q = 0,9$ bei 77 K. Alle Konfigurationen sind dunkelstromlimitiert; das theoretische Limit ergibt sich für $\eta_q = 1$ bei reinem Photonengeräusch, d.h. bei einem Dunkelstromgeräusch von Null. Variante D_2^* wird aus den im Text genannten Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet. Der Laser wird so justiert, dass die Linearitätsgrenze von 10 mW erreicht wird.

im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete das niedrigste. Dennoch wurde dieser Detektortyp aus folgenden vier Gründen verwendet:

- Die in Abschnitt 3.2.2 genannten Gründe der einfacheren Handhabbarkeit eines TE-gekühlten Detektors sprechen gegen eine Stickstoffkühlung.
- Gegenüber dem TE-gekühlten Detektor mit höherer Linearitätsgrenze bietet der verwendete Detektortyp eine höhere Flexibilität: Durch die Abschwächung aufgrund der Strahlteilung (T_{St}), der vier Spiegel (R_{Sp}), des ATR-Kristalls (T_{ATR}), der Linse (T_L) und der Detektorvoroptik (T_{det}) wird die Leistung, die an dem ersten Detektor ohne Abschwächung ankommt, nach Gleichung 3.18 für den gezeigten Aufbau bereits auf grob abgeschätzte 190 mW abgeschwächt. Durch zukünftige Verwendung z.B. einer Faser zum Strahltransport oder auch durch aufwändigere Strahlengangsformung würde die Leistung weiter abgeschwächt werden, u. U. auf unter 100 mW. Der höhere Linearitätsbereich bis 100 mW

könnte dann nicht mehr genutzt werden und das SNR würde sinken (vgl. Abbildung 3.10).

$$\begin{aligned} P_{det} &= P_{L,max} \cdot T_{St} \cdot R_{Sp}^4 \cdot T_{ATR} \cdot T_L \cdot T_{det} = \\ &= 800 \text{ mW} \cdot 0,5 \cdot 0,95^4 \cdot 0,65 \cdot 0,95 \cdot 0,95 \approx 190 \text{ mW} \end{aligned} \quad (3.18)$$

- Das Signal-Rausch-Verhältnis auch für den verwendeten Detektor ist so hoch, dass das Detektorrauschen nicht der sensitivitätslimitierende Faktor des Aufbaus ist; limitierend sind signalabhängige Störgrößen, wie in Abschnitt 3.7.3 gezeigt.
- Durch die Abschwächung des Strahls auf die Linearitätsgrenze des Detektors von ca. 10 mW wird der in Abschnitt 3.4 genannte Grenzwert der Strahlungsbelastung erfüllt.

Die bisher dargestellten Werte zeigen das SNR für die Spektralbereiche, in denen der Laser maximal emittiert. Andere Bereiche, z.B. an den Randbereichen der einzelnen Kavitäten, emittieren schwächer, wie im Laufe der folgenden Abschnitte gezeigt wird. Nach Abbildung 3.10 ist das SNR in diesen Bereichen niedrigerer Laserintensität entsprechend geringer. Inhalt des vorliegenden Abschnitts ist jedoch der Vergleich unterschiedlicher Detektortypen, nicht eine Spezifizierung des Messrauschens. Eine Charakterisierung der Rauscheinflüsse auf die spektralen Messungen erfolgt in Abschnitt 3.7.3.

Datenerfassungskarte

Die verwendete Datenerfassungskarte basiert auf einem *ZedBoard* (Avnet Inc., Phoenix, USA) und einem zweikanaligen Analog-Digital-Wandler (FMC150, 4DSP LLC, Austin, USA). Die Steuerung der Datenaufnahme geschieht, wie in Abbildung 3.12 skizziert, über einen Lasertrigger. Jeder Laserpuls wird mit jeweils 128 Messpunkten erfasst und auf der Karte gespeichert, sobald ein Lasertrigger empfangen wird.

Der interne Speicher der Datenerfassungskarte reicht nicht aus, um alle Daten einer Messung zu speichern. Aus diesem Grund werden nach 40 aufgenommenen Pulsen die auf der Karte gespeicherten Werte an den Steuerungsrechner übertragen und dort von dem im nächsten Abschnitt erwähnten in C-Sharp verfassten Programm in einer Textdatei gespeichert. Bei einem spektralen Scan von 1680 cm^{-1} bis 970 cm^{-1} mit einer Scandauer von 16,5 s werden daher nicht alle, sondern nur etwa 21 % der ca. $1,15 \times 10^6$ emittierten Laserpulse⁹ aufgenommen.

Durch Zählen des Lasertriggers während einer Datenübertragungspause wird die Anzahl der

⁹Bei einer Pulswiederholrate von 100 kHz müssten im Zeitraum von 16,5 s $1,65 \times 10^6$ Pulse emittiert werden. Während der Kavitätenwechsel werden allerdings keine Pulse emittiert, daher ist die tatsächliche Zahl niedriger.

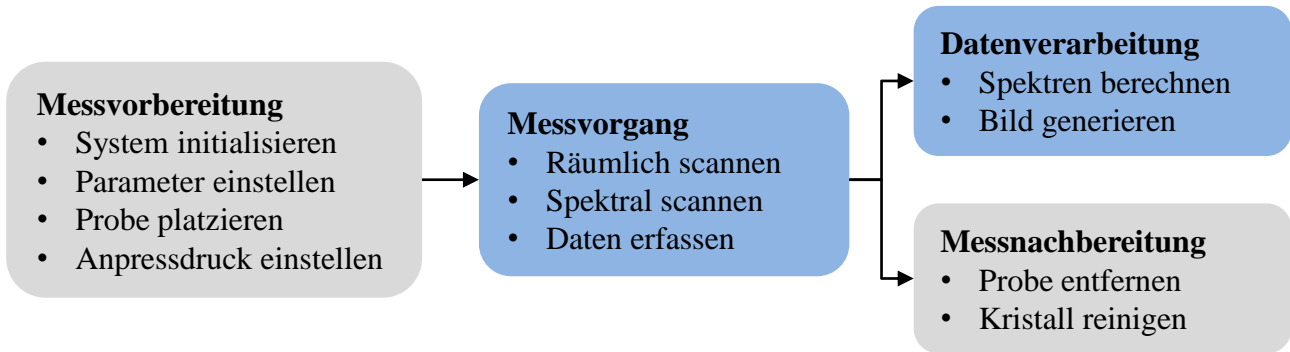


Abbildung 3.11: Übersicht über die Prozesse einer spektralen Messung mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisierten Spektrometer. Grau hinterlegte Prozesse werden vom Bediener ausgeführt, blau hinterlegte Prozesse vom Messsystem.

nicht detektierten Pulse erfasst. Die Werte der entstehenden spektralen Lücken können so entsprechend der Pausendauer linear interpoliert werden (s. Abschnitt 3.6.2).

Als Alternative zur linearen Interpolation könnte das Beugungsgitter des Lasers bei jeder Datenübertragungspause angehalten werden. Dies würde die Messdauer aufgrund der limitierenden Laserelektronik jedoch erheblich verlängern. Mit einer Datenerfassungskarte, die über einen größeren Speicher verfügt, wäre es möglich alle emittierten Pulse aufzunehmen. In Abschnitt 3.7.2 wird allerdings darauf eingegangen, dass die durch die Datenübertragungspausen verlorengelassene spektrale Information im Vergleich zur spektralen Auflösung des Spektrometers vernachlässigbar ist. Eine höhere Aufnahmezeit würde daher vermutlich keine Verbesserung des Spektrometers bewirken.

Die Programmierung und Auslegung der Datenerfassungskarte war nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

3.6.2 Ablauf einer Messung

In diesem Abschnitt werden die Vorgänge während einer Messung beschrieben. Abbildung 3.11 zeigt eine Übersicht dieser Vorgänge, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

Messvor- und Nachbereitung

In diesem Abschnitt wird auf die in Abbildung 3.11 grau hinterlegten Prozesse eingegangen, d.h. auf die Tätigkeiten, die der Bediener des Spektrometers während einer Messung ausführt.

Erster Schritt vor einer Messung ist die Systeminitialisierung durch den Bediener. Teil dessen sind das Einschalten der Detektor- und der Laserkühlung sowie das Zurücksetzen der Kreuztischmotoren für einen definierten Anfangsort. In einem nächsten Schritt werden Messparameter festgelegt wie z.B. der spektrale Durchstimmbereich, die spektrale Durchstimmgeschwindigkeit, die Bildgröße und die räumliche Schrittweite.

Um die Messung an lebendem, feuchtem Gewebe nachzustellen (s. Abschnitt 3.1), werden frische Gewebeproben auf dem ATR-Kristall mit der zu messenden Seite nach unten platziert (s. Abbildung 3.1). Um ein Austrocknen der Probe zu verhindern, kann der Kristall vor der Probenplatzierung, je nach Anwendung, z.B. mit Wasser benetzt oder auch die gesamte Vertiefung mit Flüssigkeit gefüllt werden. Durch die Anpressvorrichtung ist es möglich, die Probe mit einem definierten Anpressdruck anzupressen und dadurch den Wassereinfluss zu reduzieren (s. Abschnitt 3.2.1).

Nach der Messung wird die Probe entfernt und der ATR-Kristall gereinigt, beispielsweise mit Wasser oder Ethanol. Dieser Schritt ist wichtig, da aufgrund der geringen Eindringtiefe der evaneszenten Welle d_p nach Gleichung (2.21) entsprechend geringe Rückstände die Messung verändern können.

Messvorgang

In diesem Abschnitt wird auf den Signal-, Daten-, Material- und Strahlungsfluss während einer Messung eingegangen sowie auf den Ablauf spektraler und räumlicher Scanvorgänge.

Abbildung 3.12 zeigt eine Übersicht über die zentralen Informations-, Material- und Energieflüsse während eines Messvorgangs. Das QCL-System, die beiden Bewegungsachsen (Kreuztisch) sowie die zweikanalige Datenerfassungskarte empfangen Steuerungssignale vom Steuerungsrechner und melden im Gegenzug ihre Zustände an den Steuerungsrechner, um beispielsweise Auskunft darüber zu geben, ob ein räumlicher oder spektraler Scan abgeschlossen wurde.

Mithilfe der Bewegungseinheiten wird die Probe bewegt, so dass die Laserstrahlung unterschiedliche Orte der Probe erfasst. Wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, erfasst der erste Detektor die im ATR-Kristall reflektierte Strahlung, der zweite Detektor erfasst die Laserstrahlung direkt. Die vorverstärkten analogen Detektorsignale werden an die Datenerfassungskarte übertragen und von dort in digitaler Form an den Steuerungsrechner gesendet. Wie beschrieben werden nur die Laserpulse und nicht die Daten zwischen den Pulsen aufgenommen (vgl. Abbildung 3.3). Dieser Vorgang wird über einen Lasertrigger gesteuert.

Der Ablauf eines Messvorgangs ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Das System arbeitet scannend, sowohl räumlich als auch spektral. Die räumlichen Orte werden nacheinander angefahren, an jedem Ort wird der Laser spektral durchgestimmt. Für einen spektralen Scan wird das Beu-

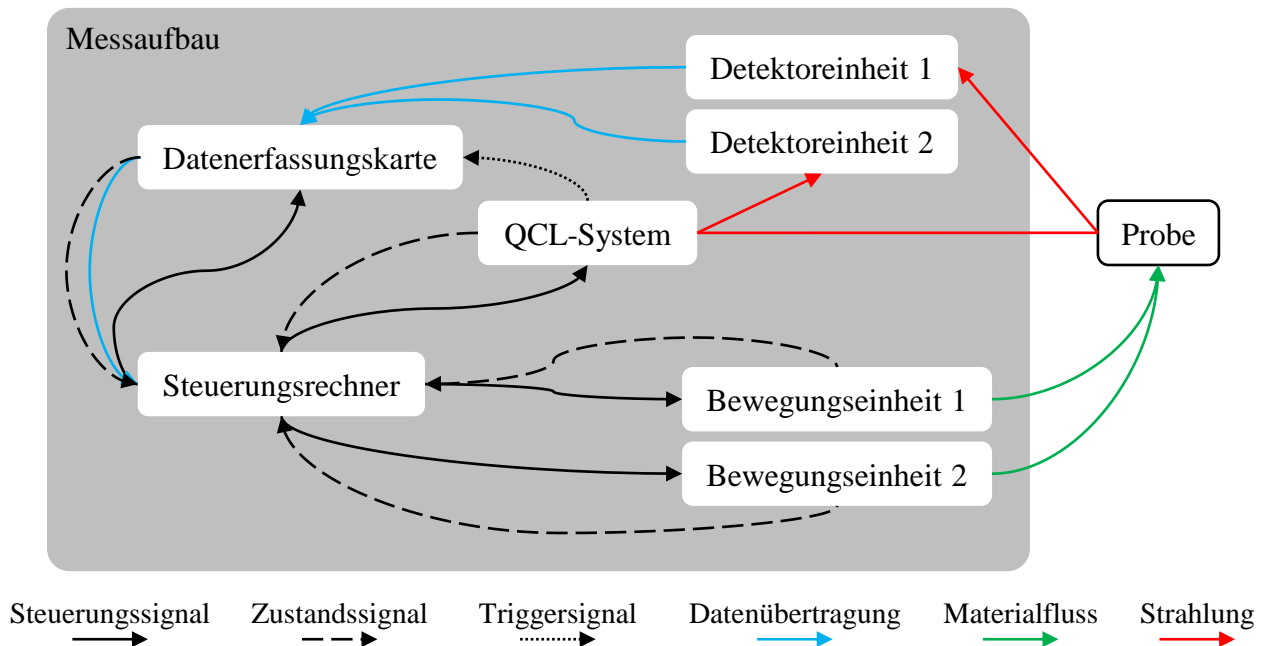


Abbildung 3.12: Signal-, Daten-, Material- und Strahlungsfluss während eines Messvorgangs. Die grau hinterlegten Bestandteile sind Teil des Messaufbaus. Die Bewegungseinheiten bestehen jeweils aus Motor und Motorsteuerung; die Detektoreinheiten bestehen jeweils aus Detektor, Detektorkühlung, Kühlersteuerung und Vorverstärker; das QCL-System besteht u. a. aus Laserkavitäten, Beugungsgitter sowie Laser- und Gittersteuerung.

gungsgitter des QCL-Systems von der Start- zur Zielwellenlänge kontinuierlich gedreht, während der Laser emittiert. Jeder Puls wird somit bei einer anderen Wellenlänge ausgegeben. Dieses Vorgehen ist aufgrund der limitierenden Laserelektronik schneller als das Anhalten des Gitters in bestimmten Frequenzabständen (z.B. alle 4 cm^{-1}).

Als Steuerungsrchner wird ein Notebook (Celsius, Fujitsu Siemens Computers, München, D.) mit 4 Gigabyte RAM Arbeitsspeicher und einem Windows 7 64 Bit-Betriebssystem verwendet. Die Steuerung des in Abbildung 3.13 dargestellten Messvorgangs erfolgt über ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstelltes Programm in LabVIEW (Version 9.0, National Instruments, Austin, USA). Die Kommunikation zwischen Steuerungsrchner und QCL-System sowie Kreuztisch erfolgt über USB-Verbindungen, die Kommunikation mit der Datenerfassungskarte sowie die Datenübertragung über eine Ethernet-Verbindung.

Zur Steuerung des Lasersystems werden in das genannte LabVIEW-Programm eingebundene *Dynamic Link Libraries* (DLLs) des Laserherstellers verwendet.

Zur Steuerung des Kreuztisches werden vom Hersteller vorgegebene ASCII-Steuerbefehle aus dem LabVIEW-Programm an die jeweilige Motorsteuerung geschickt und dort von der Firmware in Maschinensprache übersetzt.

Die Ansteuerung der Datenerfassungskarte geschieht über den Aufruf eines auf dem Steue-

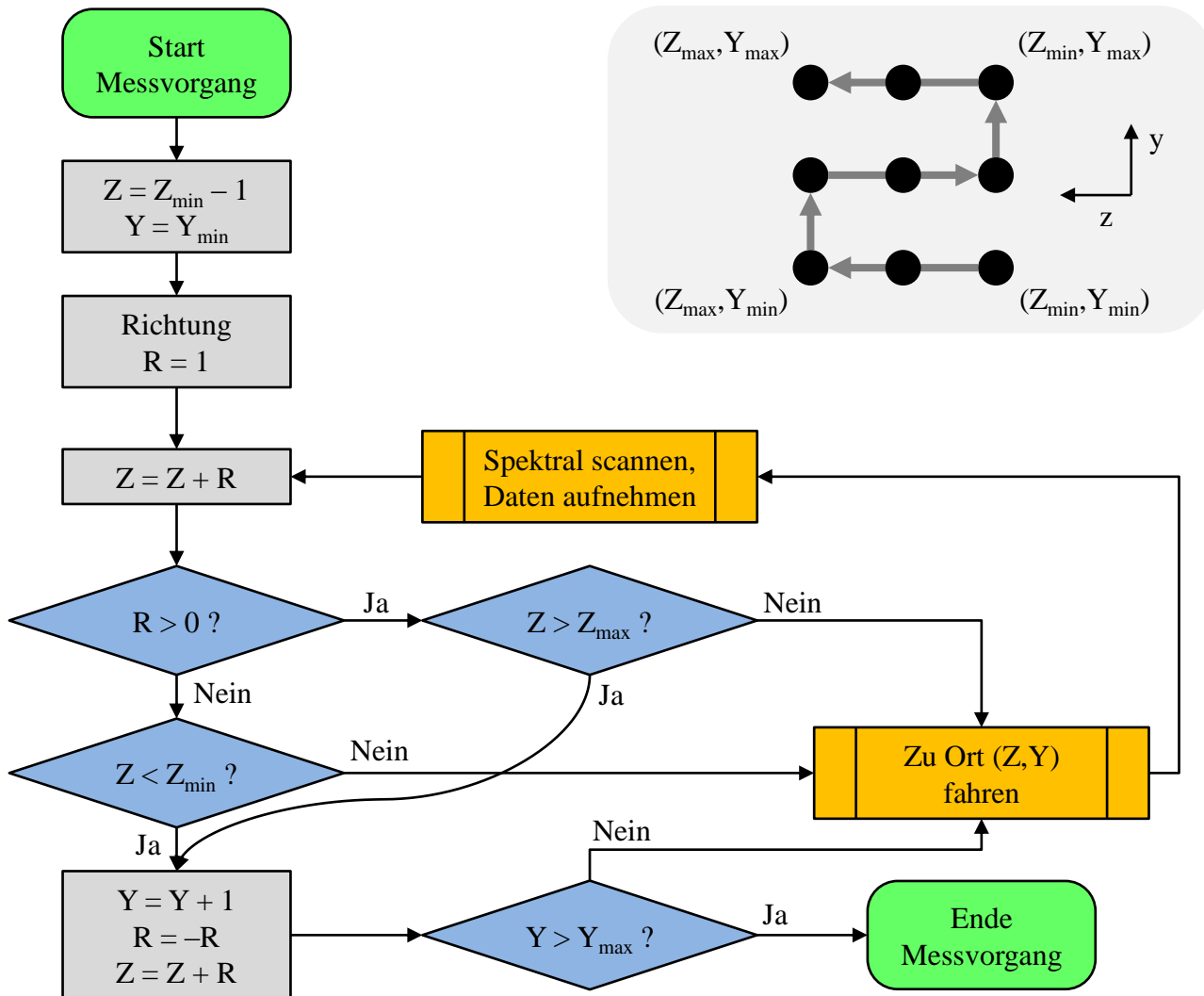


Abbildung 3.13: Das Flussdiagramm zeigt den Ablauf eines Messvorgangs. Rechts oben ist die resultierende mäanderförmige Bewegung beispielhaft für 3×3 Messorte dargestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden 64 Orte in einer Fläche von $8 \times 8 \text{ mm}^2$ mit einer Schrittweite von 1 mm in beide Richtungen gescannt (s. Abschnitt 3.2.3).

rungsrechner installierten, in C-Sharp (Microsoft, Redmond, USA) verfassten Programms aus dem Labview-Programm heraus. Die Programmierung dieses C-Sharp-Programms war nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

Datenverarbeitung

Die Datenauswertung erfolgt über ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstelltes Programm in MATLAB (R2007b, MathWorks, Natick, USA). Für die Berechnung eines Absorbanzspek-

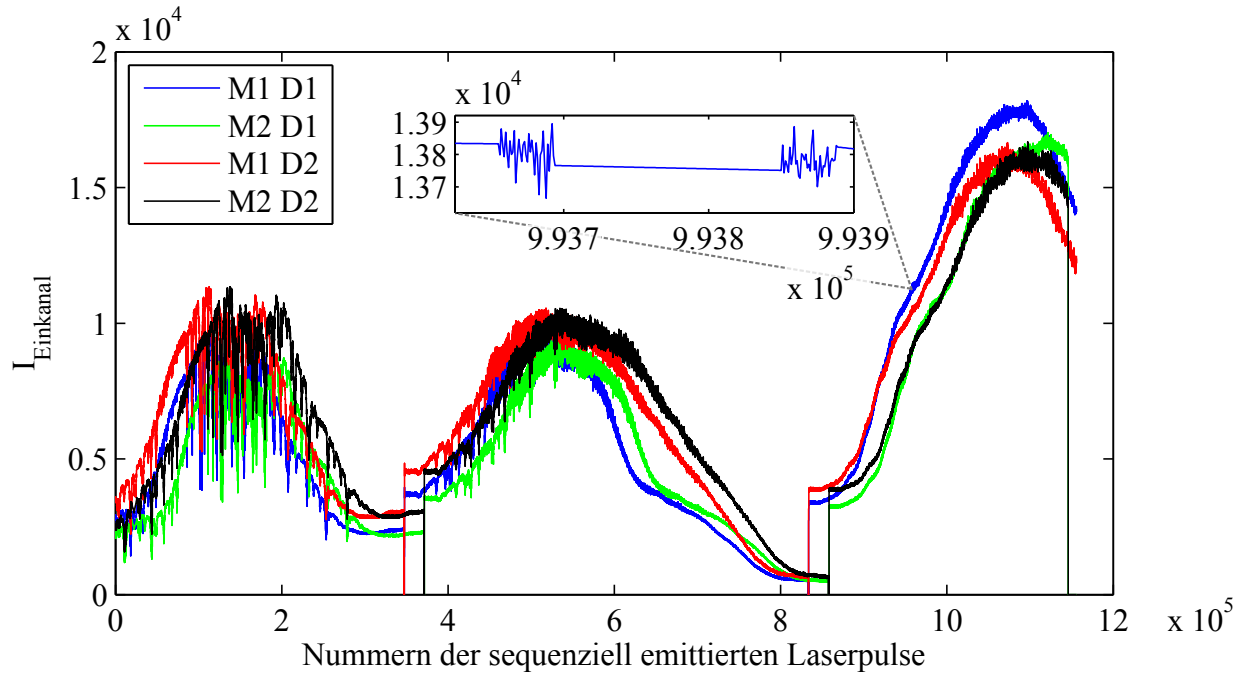


Abbildung 3.14: Einkanalspektren von Hintergrundmessung (M1) und Probenmessung (M2) der beiden Kanäle D1 und D2. Aufgrund variierender Start- und Zielwellenlängen für jede Laserkavität liegen die Spektren von M1 und M2 nicht übereinander. Der Detailausschnitt zeigt beispielhaft die Aufnahme von zweimal 40 Pulsen mit einer dazwischenliegenden Datenübertragungslücke, in der die Intensitätswerte interpoliert werden.

trums werden die auf dem Steuerungsrechner in Textdateien gespeicherten Rohdaten¹⁰ der zweikanaligen Hintergrund- und Probenmessungen ausgelesen. Unter Verwendung der darin gespeicherten Triggerinformationen werden die Pulswerte dem Zeitpunkt ihrer Emission nach angeordnet und die während der Datenübertragung nicht aufgenommenen Werte interpoliert. In den Abbildungen 3.14 und 3.15 sind beispielhaft die resultierenden Einkanalspektren der beiden Messungen und Kanäle gezeigt.

Wie erwähnt ermöglicht der Laser bei einem Scan mit maximaler Geschwindigkeit keine Zuordnung der emittierten Pulse zu bestimmten Wellenzahlen. Daher liegen die Einkanalspektren von Hintergrund- und Probenmessung nicht übereinander (s. Abbildung 3.14).

Die Referenzspektren (Detektor D2) einer Hintergrund- und einer Probenmessung werden aus diesem Grund in Richtung der Wellenzahl (x-Achse) gegeneinander verschoben und die Varianzen der Absorbanz (y-Achse) berechnet. Durch Anwendung der Verschiebung bei minimaler Varianz ergeben sich die in Abbildung 3.15 gezeigten „wellenzahlreferenzierten“ Spektren. Es werden für diesen Vorgang die Referenzspektren verwendet, da sich diese aufgrund des nicht vorhandenen Probeneinflusses von einer Hintergrund- zu einer Probenmessung in geringerem

¹⁰s. Unterabschnitt „Datenerfassungskarte“.

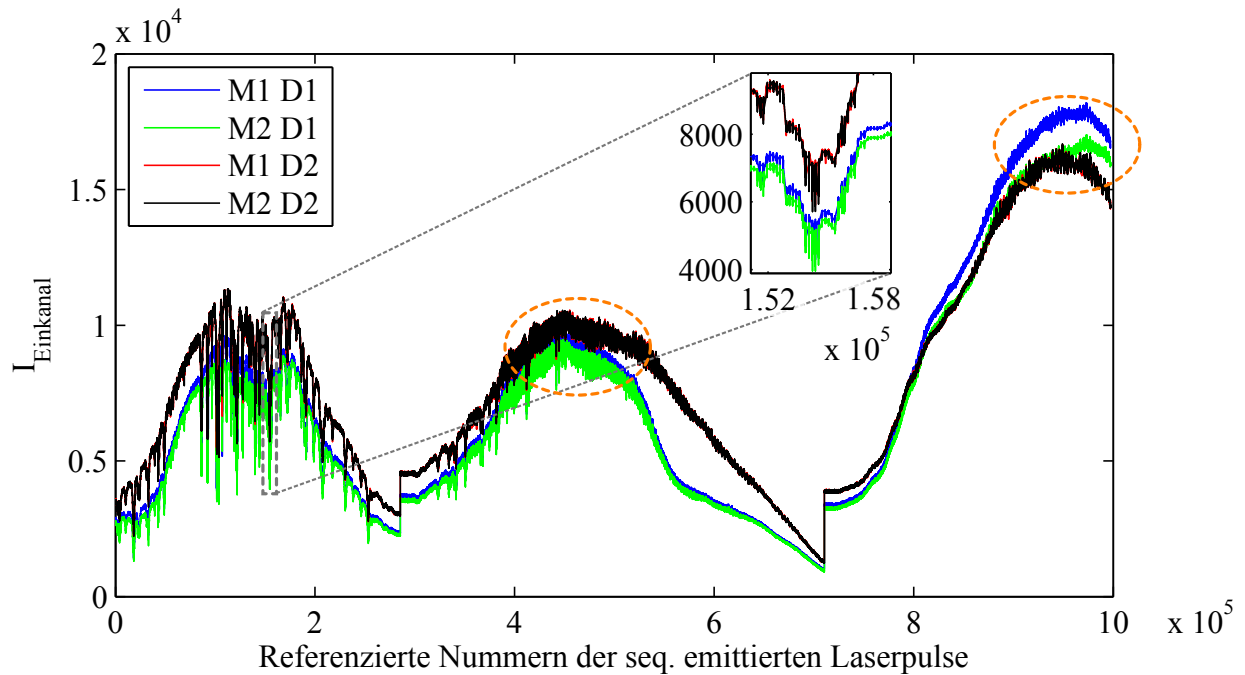


Abbildung 3.15: Übereinander gelegte Einkanalspektren durch Verschieben der in Abbildung 3.14 gezeigten Referenzspektren (M1 D2 und M2 D2) zueinander bei minimaler Absorbanzvarianz. Der Detailausschnitt zeigt eine Wasserabsorptionsbande, dort zu erkennen ist die Abfolge von Datenaufnahme und linearer Interpolation während Aufnahmeпаusen. Die in den orangefarben gekennzeichneten Bereichen zu erkennenden Signalschwankungen resultieren aus reproduzierbaren Interferenzeffekten in der Laserkavität und im optischen Aufbau.

Maße unterscheiden als die Spektren des Probenkanals.

Durch die lineare Verschiebung der Spektren zueinander mithilfe der Varianzberechnung werden auftretende nichtlineare Variationen der Gitterdrehgeschwindigkeit nicht erfasst. Nichtlineare Variationen bilden daher eine Störgröße, auf die in Abschnitt 3.7.3 näher eingegangen wird.

Aus den in Abbildung 3.15 gezeigten Einkanalspektren wird ein referenziertes Absorbanzspektrum (s. Abschnitt 3.3.1) berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.16 gezeigt. Rauschreduktion wird durch einen Tiefpassfilter mittels Fourier-Transformation und durch Glättung nach Savitzky-Golay realisiert (s. Abbildung 3.20) [GH07, S. 233]. Für diese Vorgänge werden entsprechende in MATLAB vorhandene Algorithmen verwendet.

Für die Bilderstellung wird entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.3.2 vorgegangen, die Umsetzung erfolgt in MATLAB unter Verwendung der *Imaging Processing Toolbox* (Version 6.0, R2007b, MathWorks).

Zur Berechnung der Mittenzentrierung, der Kovarianz und der Eigenvektoren im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse (s. Abschnitt 3.3.2) werden ebenfalls entsprechende in MATLAB vorhandene Funktionen verwendet.

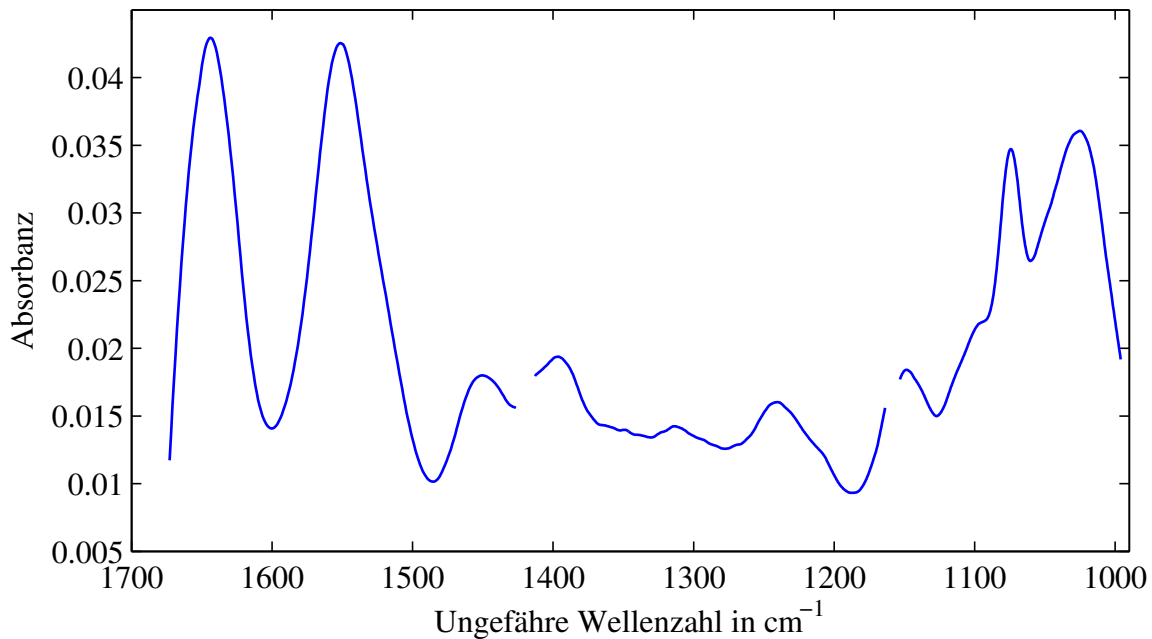


Abbildung 3.16: Aus den in Abbildung 3.15 gezeigten Einkanalspektren berechnetes referenziertes Absorbanzspektrum einer Schweineleber. Die Zuordnung der Wellenzahlen erfolgt auf Grundlage bekannter spektraler Eigenschaften [Mor04] des Spektrums (z.B. bekannter spektraler Absorptionsspeaks) und ist daher nicht exakt. Grund für dieses Vorgehen ist, dass bei maximaler Durchstimmgeschwindigkeit das QCL-System keine Kontrolle der Wellenlänge bzw. Wellenzahl ermöglicht, anders als bei neueren Systemen [YKLB15]. In Bereichen von Laserkavitätswechseln werden Daten nicht verwendet, da in diesen Abschnitten vergleichsweise hohes Rauschen und hohe Nichtlinearität der Gitterdrehgeschwindigkeit vorliegt. Rauschreduktion erfolgt durch einen auf Fourier-Transformation basierenden Tiefpassfilter und Glättung durch einen Savitzky-Golay-Filter (s. Abbildung 3.20).

Konkrete Parameter wie Schwellwerte zur Unterscheidung zwischen zwei verschiedenen Gewebearten werden in den Abschnitten der jeweiligen Experimente beschrieben.

3.7 Bildgebungseigenschaften des Spektrometers

3.7.1 Ortsauflösung

In diesem Abschnitt wird die Ortsauflösung des in Abschnitt 3.6 beschriebenen QCL-Spektrometers bestimmt und mit der Ortsauflösung eines sensitiven FTIR-Laborspektrometers verglichen.

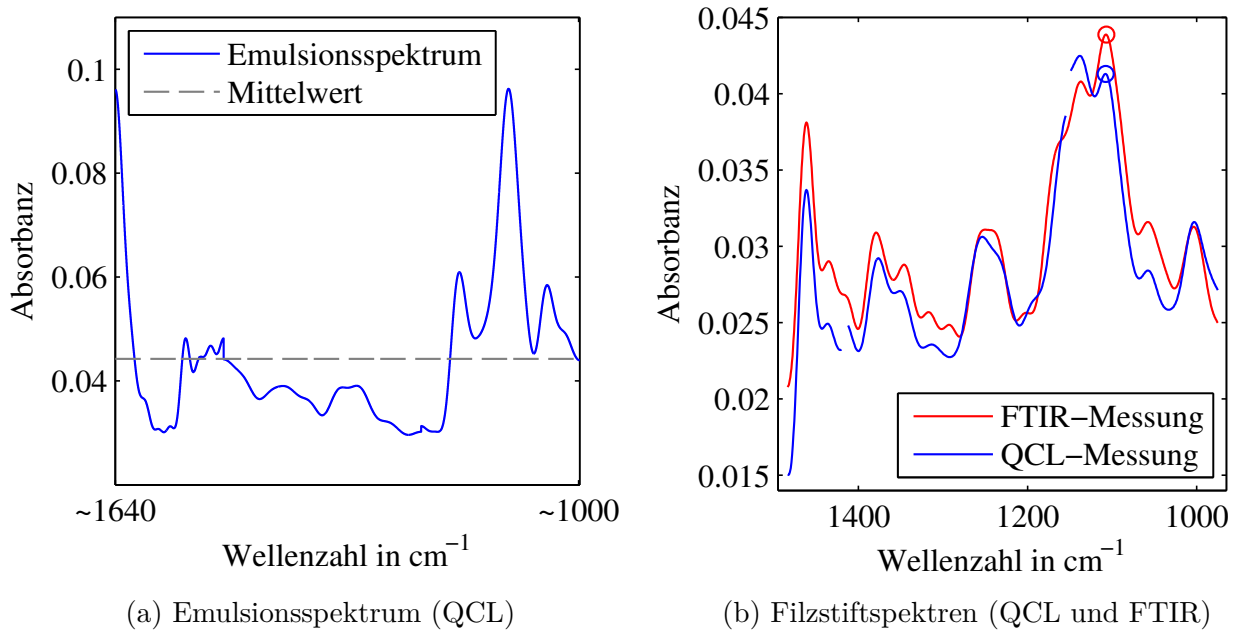


Abbildung 3.17: (a) Beispielhaftes Spektrum der für die Bestimmung der Ortsauflösung verwendeten Emulsion; als Messwert für die in Abbildung 3.18 dargestellte Bildgebung wird der gezeigte Mittelwert verwendet. (b) Mit unterschiedlichen Messmethoden aufgenommene Spektren eines schwarzen Filzstifts; die für die in Abbildung 3.19 gezeigte Bildgebung verwendeten Absorbanzwerte bei ca. 1100 cm^{-1} sind mit jeweils einem Kreis markiert. Mögliche Gründe für die Unterschiede zwischen den Spektren sind Rauschen, unterschiedliche Trocknungsgrade des Filzstifts und nichtlineare Durchstimmgeschwindigkeiten der Laserkavitäten. Die Absorbanz liegt in der Größenordnung einer Gewebemessung (vgl. Abbildung 3.16). Spektrale Lücken bei der QCL-basierten Messung entstehen aufgrund hohen Rauschens in Bereichen von Kavitätswechseln.

Material und Methoden

Zur Bestimmung der Ortsauflösung des QCL-Spektrometers wurde der Übergang zwischen dem bloßen Kristall und einer auf dem Kristall befindlichen Öl-in-Wasser-Emulsion (Cold Cream, Avène, Pierre Fabre, Paris, Frankreich) in verschiedenen Bereichen des ATR-Kristalls räumlich und spektral vermessen. Ein beispielhaftes Spektrum ist in Abbildung 3.17a gezeigt. Der Vorteil der Verwendung dieser Probe ist die zeitlich vergleichsweise konstante spektrale Charakteristik sowie die starke Absorption. Durch die Fluideigenschaft entstehen zudem keine räumlichen Lücken zwischen Kristall und Probe, wie es beispielsweise bei nicht ausreichend planen Festkörpern der Fall wäre.

Als Vergleichsproben für den Vergleich der Ortsauflösung des QCL- mit einem FTIR-Spektrometer wurden verschiedene Linien mit einem schwarzen Filzstift (edding 250, edding International GmbH, Ahrensburg, D.) direkt auf den ATR-Kristall gezeichnet. Die spektrale

Charakteristik des Filzstifts verändert sich aufgrund von Trocknung und einer damit verbundenen Änderung der stofflichen Zusammensetzung stärker als die genannte Emulsion, dafür sind komplexere Formen leichter darstellbar. Beispielhafte Filzstiftspektren sind in Abbildung 3.17b gezeigt.

Für die FTIR-Messungen wurde ein Spektrometer des Modells *IFS66VS*¹¹ (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D.) verwendet. Bei dem Spektrometer handelt es sich um ein sensitives Laborspektrometer mit einem stickstoffgekühlten MCT-Detektor. Der in Abbildung 3.8 gezeigte ATR-Aufbau, bestehend aus ATR-Kristall mit Halterung und automatisiertem Kreuztisch, wurde in der Probenkammer des FTIR-Spektrometers installiert. Mehrere Stunden vor der Messung wurden Optik- und Detektorkammer evakuiert und die Lichtquelle eingeschaltet, um einen stationären Betrieb zu ermöglichen. Zur Steuerung des Spektrometers wurde die Software *OPUS* (Version 6.0, Bruker Optik GmbH) verwendet. Die Auswertung erfolgte im Spektralbereich des QCL-Spektrometers, d.h. zwischen ca. 1680 cm^{-1} und 970 cm^{-1} . Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen und es wurde über 50 Spektren pro Ort gemittelt. Die Aufnahme eines vollständigen Scans von 64 Pixel dauerte ca. 25 min.

Zur Unterscheidung zwischen bemalten und unbemalten Bereichen des Kristalls wurde das jeweilige in Abbildung 3.17b gezeigte Absorbanzmaximum der Bande bei etwa 1100 cm^{-1} verwendet.

Für jedes Bild wurden auf Grundlage der gemessenen Absorbanzmaxima Grauwertmatrizen gebildet. In Anlehnung an die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Gewebeexperimente sind dabei die niedrigsten 25 % der Maxima dargestellt durch schwarze Pixel, die höchsten 25 % durch weiße Pixel. Die mittleren 50 % sind entsprechend ihres Wertes durch Graustufen zwischen schwarz und weiß dargestellt. Im Falle der erwähnten Gewebeuntersuchungen ermöglicht dies eine sichtbare Unterscheidung zwischen Gewebearten bei gleichzeitiger Darstellung von Übergangsbereichen.

Um eine klare Aussage darüber zu treffen, ob ein gemessenes Spektrum einem unbemalten oder einem bemalten Ort zuzuordnen ist, wurde für jedes Pixel eine Entscheidung mithilfe eines Schwellwerts getroffen. Im Rahmen dieser Untersuchung entspricht dieser Schwellwert dem Mittelwert der mittleren 50 % der Absorbanzmaxima eines Bildes.

Ergebnisse

Abbildung 3.18 zeigt eine Ortsauflösung von etwa 1 mm. Im rechten Bereich des Kristalls ist die Auflösung etwas schlechter als in den anderen drei Bereichen. Grund dafür ist vermutlich

¹¹Vorgängerversion der Bruker VERTEX-Reihe

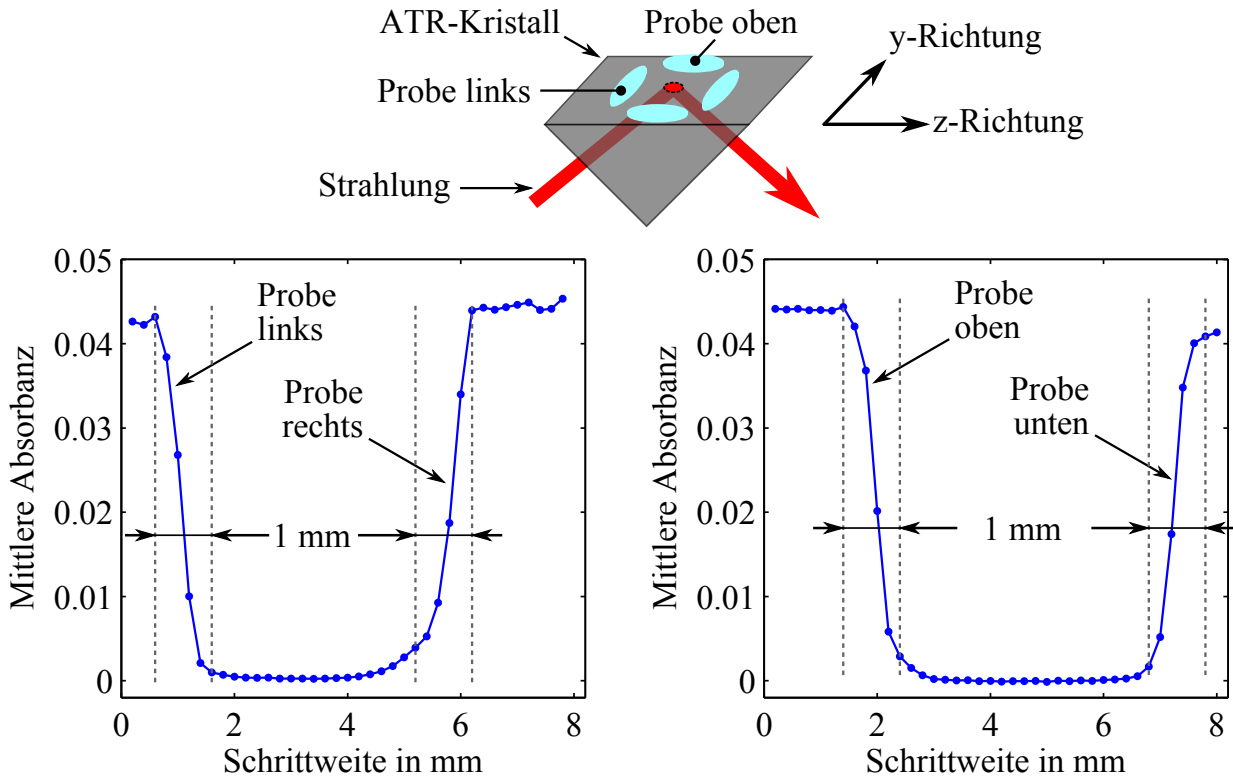


Abbildung 3.18: Bestimmung der Ortsauflösung entlang der in Abbildung 3.8 gezeigten z- und y-Achse. Die Schrittgrößen betragen in jede Richtung $200\ \mu\text{m}$. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert des an der jeweiligen Stelle aufgenommenen Absorbanzspektrums (s. Abbildung 3.17a). Zu erkennen ist, dass die Auflösung im rechten Bereich des Kristalls etwas schlechter ist als in den anderen drei Bereichen.

ein größerer Strahldurchmesser in diesem Abschnitt. In Abbildung 3.19 links ist anhand der Vermessung der gezeigten Filzstiftkreisform gezeigt, dass die Filzstiftlinie, die eine Dicke von etwa 1,5 bis 2 mm aufweist, aufgrund der Auflösung von etwa 1 mm korrekt dargestellt wird.

In Abbildung 3.19 ist rechts zu sehen, dass die Messung mit dem QCL-Spektrometer unter Verwendung der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Referenzmessung als einziges Ergebnis die orthogonalen Linien korrekt wiedergibt. Wird die vom zweiten Detektor gemessene Laserpulschwankung nicht berücksichtigt, so verschlechtert dies wie gezeigt die korrekte Bildwiedergabe. Auf die Gewebemessungen ist dies übertragbar, da die Filzstiftabsorption in der Größenordnung der Gewebeabsorption liegt (vgl. Abbildungen 3.17b und 3.16).

Die Graustufenbilder der FTIR-Messungen in Abbildung 3.19 zeigen im Vergleich zu den QCL-Messungen die Striche etwas verschmiert. Für die größere Apertur¹² von 1,5 mm in Abbildung 3.19 ist dieser Effekt erwartungsgemäß höher als für die kleinere Apertur von 0,25 mm.

¹²Durch die Apertur wird im Spektrometer die Ortsauflösung eingestellt, indem ein Teil der Strahlung weggeschnitten wird.

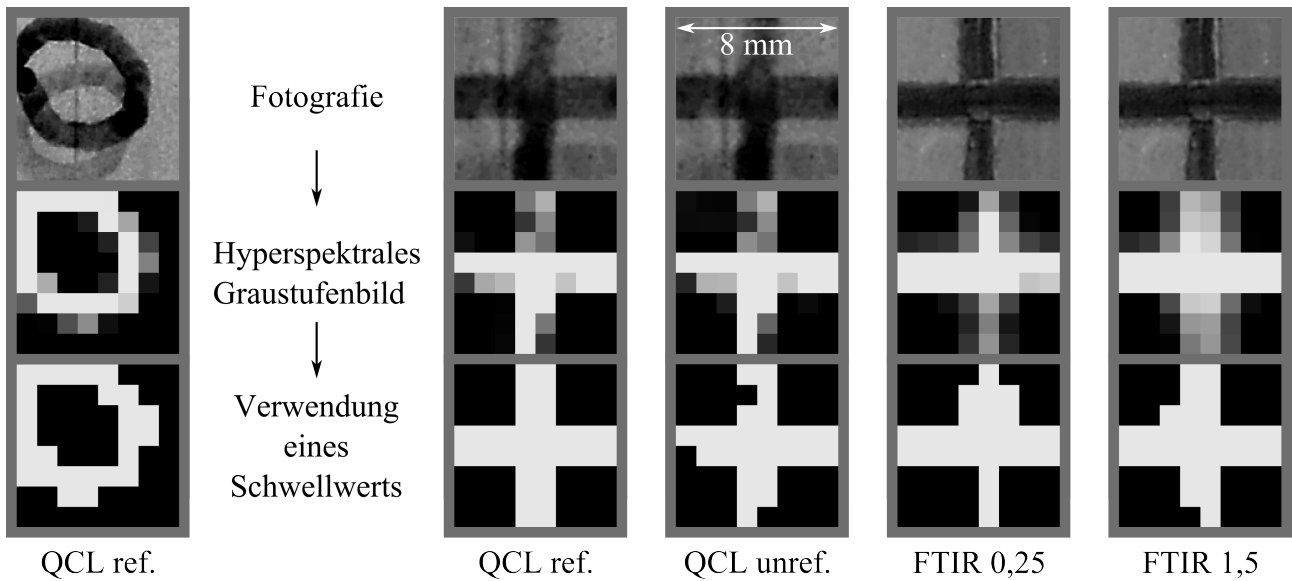


Abbildung 3.19: Links: Bildgebung einer direkt auf den ATR-Kristall gezeichneten Kreisform; verwendet wurde das QCL-Spektrometer unter Berücksichtigung der Referenzmessung; die Dicke der Linie liegt zwischen 1,5 und 2 mm. Rechts: Bildgebung zueinander orthogonaler Linien einer Dicke von ungefähr 1,9 mm für den Vergleich unterschiedlicher Messmethoden in Bezug auf Ortsauflösung; von links nach rechts: QCL-Spektrometer unter Verwendung der Referenzmessung durch zweiten Detektor, QCL-Spektrometer ohne Verwendung der Referenzmessung, FTIR-Spektrometer unter Verwendung der kleinstmöglichen Apertur von 0,25 mm, FTIR-Spektrometer unter Verwendung einer Apertur von 1,5 mm. Die referenzierte QCL-Messung gibt bei Verwendung eines Schwellwerts, der dem Mittelwert der mittleren 50% der Absorbanzmaxima entspricht, als einzige Messung die Linien korrekt wieder.

Auch die Schwarzweißbilder der FTIR-Messungen zeigen die orthogonalen Linien nicht korrekt. Die Ergebnisse lassen sich begründen durch die gegenüber dem QCL schlechtere Strahlqualität der FTIR-Strahlungsquelle (Global, s. Abschnitt 2.2.2). Zum einen wird die Strahlung dadurch nicht so gut fokussiert wie beim QCL-Spektrometer, zum anderen wird bei Verwendung der Aperturen von 0,25 mm bzw. 1,5 mm ein Großteil der Strahlung weggeschnitten, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis niedriger ist als beim QCL-Spektrometer.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass der ATR-Aufbau für das QCL- und nicht das FTIR-Spektrometer konstruiert wurde. Mit einer aufwändigeren Formung des Strahlengangs wären vermutlich auch mit dem FTIR-Spektrometer bessere Ergebnisse zu erzielen. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen dennoch die höhere Strahlqualität des Lasers und die damit verbundene einfachere Bildgebung.

3.7.2 Spektrale Auflösung

Einflüsse auf die spektrale Auflösung eines Spektrums sind die *Laserlinienbreite*, die *Abtastrate* der Laseremission sowie der Umfang der *Rauschreduktion*. Auf diese Einflüsse wird im Folgenden eingegangen.

Die **Laserlinienbreite** wird vom Hersteller mit $\leq 1 \text{ cm}^{-1}$ (Halbwertsbreite) angegeben [Day13b] und bei [BL12] bestätigt. Dieser Einfluss ist für den verwendeten Laser ein unveränderlicher Parameter und beschreibt somit die obere Grenze der möglichen Auflösung.

Die **Abtastrate** der Laseremission wird bestimmt durch die in Abbildung 3.14 gezeigten Aufnahmepausen während einer Datenübertragung. Durch die Pausen entstehen spektrale Lücken, in denen die Werte linear interpoliert werden. Absorptionsbanden in diesen Lücken werden somit nicht erfasst.

Wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, werden während eines spektralen Scans von ca. 1680 cm^{-1} bis 970 cm^{-1} näherungsweise $1,15 \times 10^6$ Pulse emittiert. Auf Grundlage dieser Werte kann die mittlere spektrale Differenz zwischen zwei emittierten Laserpulsen nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\frac{1680 \text{ cm}^{-1} - 970 \text{ cm}^{-1}}{1,15 \times 10^6} \approx 6,17 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \quad (3.19)$$

Während einer Datenübertragungspause werden etwa 190 Pulse emittiert. Die entstehende spektrale Lücke hat somit eine spektrale Größe von ungefähr $190 \cdot 6,17 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \approx 0,12 \text{ cm}^{-1}$. Dieser Wert ist kleiner als die genannte Laserlinienbreite von 1 cm^{-1} , d.h. die Laserlinienbreite bestimmt die erreichbare spektrale Auflösung des Spektrometers. Die in den Abbildungen 3.14 und 3.15 gezeigten Einkanalspektren haben diese Auflösung, da auf diese Spektren keine Rauschreduktion angewendet wurde.

Wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, werden zur **Rauschreduktion** ein Tiefpass- und ein Glättungsfilter verwendet, um den Einfluss von Laserpulsschwankungen, Datenerfassungsrauschen oder den Einfluss atmosphärischer Schwankungen zu reduzieren. Durch die Rauschreduktion werden entsprechend schmale Absorptionsbanden u. U. nicht mehr aufgelöst.

Abbildung 3.20 zeigt ein mit dem QCL-Spektrometer aufgenommenes Spektrum von Isopropanol im Vergleich mit dem eines FTIR-Spektrometers. Die für das Spektrum verwendeten Einstellungen der Tiefpass- und Glättungsalgorithmen sind vergleichbar mit den Einstellungen wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Gewebemessungen verwendet werden. Das Spektrum zeigt, dass eine spektrale Auflösung zwischen 20 cm^{-1} und 30 cm^{-1} (Halbwertsbreite) *nach* Rauschreduktion zu erwarten ist.

Die im Stand der Forschung (Abschnitt 1.4) beschriebenen Auflösungen zwischen 2 cm^{-1} und 16 cm^{-1} beziehen sich auf die spektrale Auflösung *vor* etwaiger Rauschreduktion (z.B. durch

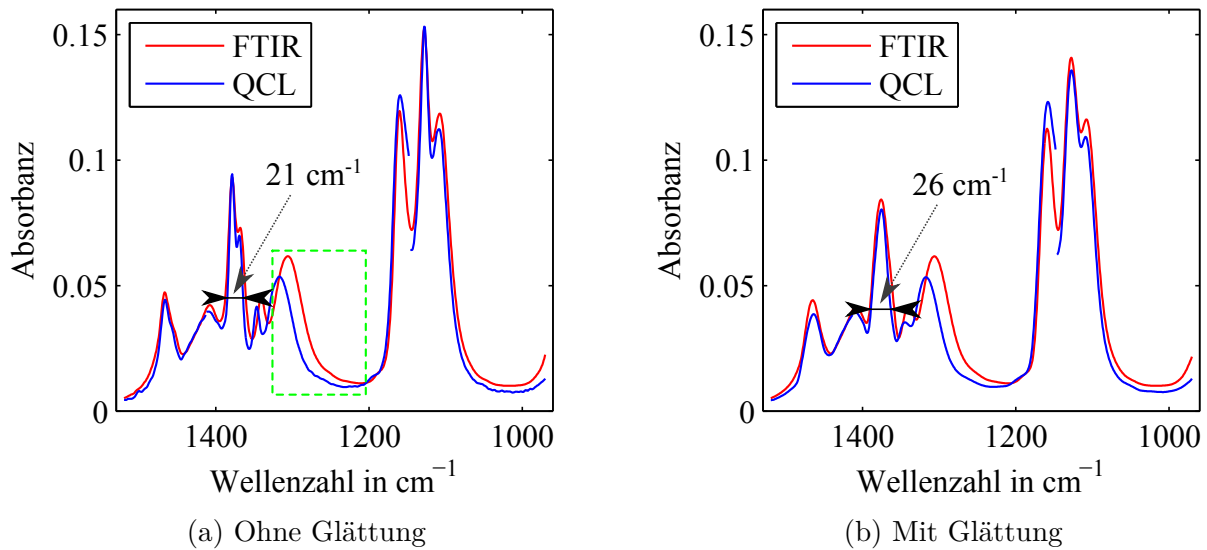


Abbildung 3.20: Zu erwartende spektrale Auflösung des QCL-Spektrometers nach Datenverarbeitung, gezeigt anhand von Isopropanolspektren. (a) Mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommenes FTIR-Spektrum sowie ein QCL-Spektrum, das einer FFT-Rauschfilterung unterzogen wurde. (b) Anwendung eines Savitzky-Golay-Filters zweiter Ordnung mit 41 Stützpunkten bei 1000 Messpunkten auf beide Spektren; die in (a) beispielhaft gezeigte spektrale Halbwertsbreite von ungefähr 21 cm^{-1} des QCL-Spektrums beträgt bei (b) in etwa 26 cm^{-1} . Ein wahrscheinlicher Grund für die spektralen Verschiebungen zwischen der FTIR- und der QCL-Messung (grün markiert) ist eine nichtlineare Gitterdrehgeschwindigkeit des QCL-Systems. Spektrale Lücken in den QCL-Spektren entstehen in Bereichen von Kavitätswechseln.

Glättungsfilter). Aussagen über die tatsächliche spektrale Auflösung *nach* Datenverarbeitung werden dort nicht getätigt. Die Bestimmung der exakten spektralen Auflösung scheint zudem nicht unmittelbar relevant für die Gewebeunterscheidung. Dies ist z.B. auch daran ersichtlich, dass die in Abschnitt 1.4 beschriebenen Auflösungen zwischen 2 cm^{-1} und 16 cm^{-1} variieren und deren Verwendung i. d. R. nicht näher begründet wird.

3.7.3 Rauschen

Signalabhängiges Rauschen

Mithilfe sogenannter „100 %-Linien“ werden Rauscheigenschaften eines Spektrometers im logarithmischen Absorbanzraum untersucht [GH07, S. 181 ff.] [Mat78, BL12, YKLB15]. Eine 100 %-Linie entspricht dabei nach [BL12] einem Absorbanzspektrum, das aus zwei identischen sequenziell aufgenommenen Einkanalspektren berechnet wird. Mit „identischen Einkanalspek-

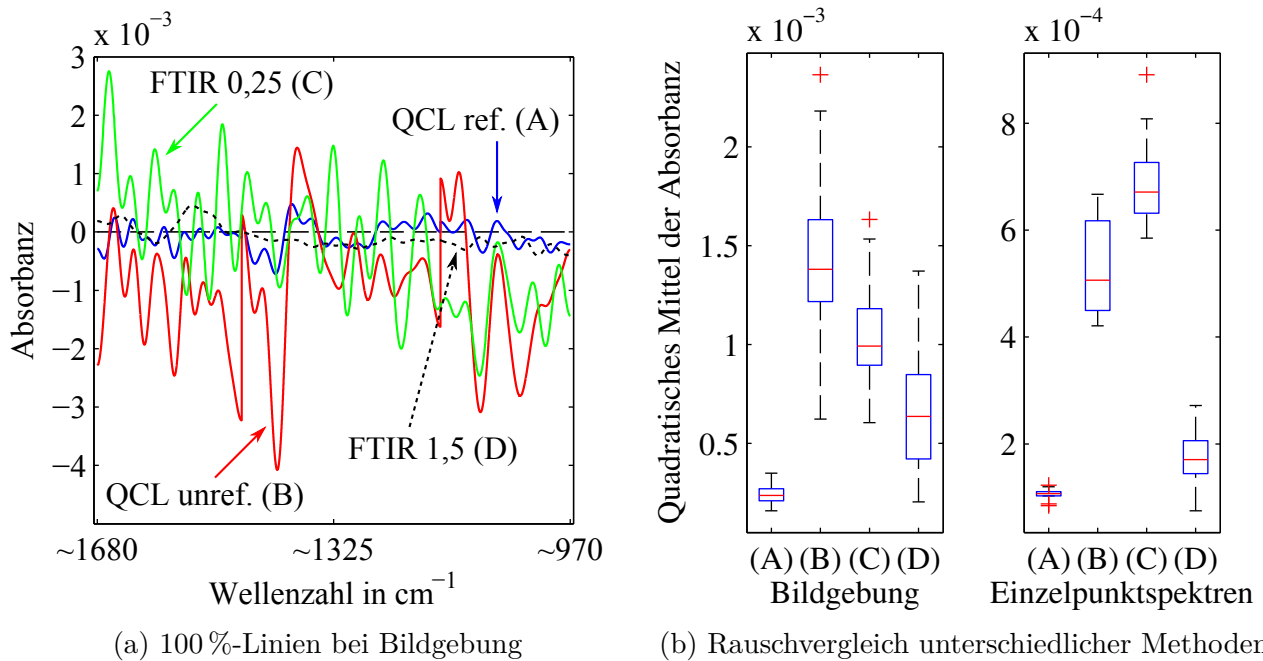


Abbildung 3.21: (a) Beispielhafte 100 %-Linien für unterschiedliche Messmethoden im Falle von Bildgebung. (A) QCL-Messung mit Referenzmessung, (B) QCL-Messung ohne Referenzmessung, (C) FTIR-Messung unter Verwendung der kleinstmöglichen Apertur von 0,25 mm und (D) FTIR-Messung unter Verwendung der Apertur von 1,5 mm. Die Wellenzahlen können nicht eindeutig zugeordnet werden, da die 100 %-Linien keine charakteristischen spektralen Eigenschaften zeigen wie z.B. ein Gewebespektrum (s. Abbildung 3.16). Die 100 %-Linien von QCL und FTIR wurden dem gleichen Tiefpass unterzogen, um eine vergleichbare Rauschbandbreite zu erhalten. Glättung wurde nicht angewendet. (b) Quadratische Mittelwerte von mehreren wie bei (a) gezeigten 100 %-Linien. Darstellung in Form von „Boxplots“ (s. Text), jeweils für Einzelpunktspektren und Bildgebung. Das Rauschen bei Bildgebung ist aufgrund zeitlicher Einflüsse bei allen Messmethoden höher als bei Einzelpunktspektren. Ursachen des Rauschens werden im Text diskutiert.

„tren“ ist gemeint, dass die Spektren unter identischen Bedingungen, d.h. Verwendung derselben Probe und derselben Messparameter aufgenommen werden. Durch die Logarithmierung des Quotienten dieser beiden Einkanalspektren (Berechnung der Absorbanz) wird das Rauschen im Absorbanzraum ermittelt.

Die zur Berechnung der 100 %-Linien verwendeten Einkanalspektren wurden mit Wasser auf dem Kristall aufgenommen. Grund dafür ist, dass Wasser die Spektrenform von feuchtem Gewebe dominiert (s. Abschnitt 4.1) und im Gegensatz zu Gewebe über den Zeitraum der Messung invariant ist.

Für den Vergleich zwischen dem QCL-Spektrometer und dem in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen FTIR-Spektrometer wurden folgende zwei Rauscharten untersucht:

- Rauschen bei spektraler Bildgebung: Ein räumlicher und spektraler Scan von 64 Pixeln dauert im Falle des QCL-Spektrometers 35 min und im Falle des FTIR-Spektrometers 25 min. Dementsprechend beträgt der Zeitraum zwischen der Aufnahme des ersten (Hintergrundspektrum) und der des zweiten Einkanalspektrums (Probenspektrum) an einem bestimmten Ort 35 min bzw. 25 min. Für die Messung wurden an 64 Orten je ein Hintergrund- und ein Probenspektrum generiert¹³. Es wurden dabei erst alle Hintergrundspektren aufgenommen, im Anschluss daran alle Probenspektren. Hintergrund- und Probenspektren wurden unter sonst identischen Bedingungen aufgenommen (gleiche Probe, gleiche Messparameter). Zur Berechnung der 100 %-Linien wurden jeweils die Spektren des gleichen Orts verwendet.
- Rauschen von Einzelpunktspektren: Im Gegensatz zur Bildgebung werden bei Einzelpunktspektren Hintergrund- und Probenspektrum direkt nacheinander aufgenommen. Ein spektraler Scan dauert im Falle des QCL-Spektrometers 33 s und im Falle des FTIR-Spektrometers 24 s. Dementsprechend beträgt der Zeitraum zwischen der Aufnahme des ersten und der des zweiten Einkanalspektrums 33 s bzw. 24 s. Für die Messungen wurden $2 \cdot 10 = 20$ Einkanalspektren an einem Ort generiert. Zur Berechnung der 100 %-Linien wurden jeweils zwei hintereinander aufgenommene Spektren verwendet.

Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis der Rauschmessung für spektrale Bildgebung und für Einzelpunktmessungen. Die blauen Rechtecke der in Abbildung 3.21b gezeigten „Boxplots“ zeigen jeweils den Bereich der mittleren 50 % der Werte, die roten horizontalen Striche den jeweiligen Median und die schwarzen Ausläufer den Bereich sämtlicher Werte ohne Ausreißer (rote Kreuze).

Bei Verwendung der Referenzmessung zeigt das QCL-Spektrometer das geringste Rauschen sowie die geringste Standardabweichung. Beim FTIR-Spektrometer ist das Rauschen bei Verwendung der Apertur 1,5 mm erwartungsgemäß niedriger als bei Verwendung der Apertur 0,25 mm. Grund dafür ist der höhere Strahlungsdurchsatz, der das Verhältnis von Signalleistung zu Dunkelstromleistung erhöht.

Die in Abbildung 3.21b gezeigte vergleichsweise hohe Varianz der FTIR-Messungen auch bei Verwendung der größeren Apertur von 1,5 mm resultiert aus aperturunabhängigen Temperatureffekten, die neben dem Detektorrauschen eine Rolle spielen. Ein Beispiel dafür ist eine mögliche Temperaturveränderung des schwarzen Strahlers innerhalb des 25-minütigen Zeitraums zwischen den Aufnahmen der beiden Einkanalspektren. Beim QCL-Spektrometer treten diese Temperatureffekte ebenfalls auf, diese werden jedoch durch die Referenzmessung reduziert.

¹³Im Falle der QCL Messung wurden pro Hintergrund- bzw. Probenspektrum jeweils zwei simultan aufgenommene Spektren durch die beiden Detektoren aufgenommen, s. Abschnitt 3.3.1. Insgesamt werden bei der Messung mit dem QCL-System somit $2 \cdot 2 \cdot 64 = 256$ Spektren aufgenommen, bei der Messung mit dem FTIR-System $2 \cdot 64 = 128$ Spektren.

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2015 [YKLB15] sind quadratische Mittelwerte (englisch „root mean square“, RMS-Werte) eines bildgebenden QCL-Spektrometers publiziert, das einen Spektralbereich von ca. 1900 cm^{-1} bis 800 cm^{-1} abdeckt und auf Basis eines stickstoffgekühlten Arraydetektors arbeitet. Die dort publizierten RMS-Werte der Absorbanz liegen bei etwa 1×10^{-2} . Abbildung 3.21b zeigt bei Verwendung des QCL-Spektrometers im Falle von Bildgebung einen RMS-Wert von $2,4 \times 10^{-4}$ als Median.

Bei [BL12] ist für ein nicht bildgebendes QCL-Spektrometer ein RMS-Wert von $2,3 \times 10^{-4}$ publiziert. Der Spektralbereich umfasst dabei den vergleichsweise kleinen Bereich zwischen 1230 cm^{-1} bis 1050 cm^{-1} , der innerhalb von 75 s mit 20 Mittelungen vermessen wird. Abbildung 3.21b zeigt bei Verwendung des QCL-Spektrometers im Falle von Einzelpunktspektren einen RMS-Wert von $1,1 \times 10^{-4}$ als Median für den Spektralbereich zwischen etwa 1670 cm^{-1} und 970 cm^{-1} , der innerhalb von näherungsweise 33 s gemessen wird.

Bei [YKLB15] werden als Gründe für die in Abbildung 3.21a gezeigten niederfrequenten Oszillationen Intensitätsschwankungen des Lasers sowie zwischen Messungen variierende Durchstimmgeschwindigkeiten genannt. Letztere führen zu Rauschen oder einem rauschähnlichen Einfluss, da das Probenspektrum durch das Hintergrundspektrum geteilt wird. Variierende Durchstimmgeschwindigkeiten zwischen den Messungen führen in diesem Fall dazu, dass die beiden Einkanalspektren in der Frequenzdimension nichtlinear gegeneinander verschoben sind und somit unterschiedliche Frequenzbereiche durcheinander geteilt werden.

Durch die Referenzmessung im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden diese Störgrößen wie gezeigt zwar deutlich reduziert, aber nicht vollständig eliminiert. An dieser Stelle limitierend wirken können z.B. die in Abschnitt 4.2.9 beschriebenen Strahllageinstabilitäten des Lasers, Nichtlinearitäten der MCT-Detektoren, Veränderungen der Luftzusammensetzung (z.B. Wasserdampfgehalt) oder Temperaturveränderungen, die die optischen Elemente der zwei Strahlengänge (D1, D2) unterschiedlich beeinflussen. Im Gegensatz zum FTIR-Spektrometer ist der Strahlengang des QCL-Spektrometers nicht evakuiert, weswegen Änderungen der Luftzusammensetzung evtl. sogar einen noch größeren Einfluss auf das QCL- als auf das FTIR-Spektrometer haben.

Es lässt sich an dieser Stelle diskutieren, ob es sich bei den in Abbildung 3.21a gezeigten Oszillationen tatsächlich um stochastisches Rauschen handelt oder um systematische Störgrößen. Die in Abbildung 3.21b gezeigten Mittelwerte wurden jeweils aus den Werten einer einzelnen 100 %-Linie berechnet, d.h. es wurde von der Frequenzunabhängigkeit der gezeigten Oszillationen ausgegangen. Diese Frequenzunabhängigkeit entspricht der Beobachtung im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Bei [YKLB15] wird jedoch für QCL-Systeme empfohlen, frequenzabhängige Mittelwerte zu berechnen, indem die Mittelwerte aus den Absorbanzwerten mehrerer 100 %-Linien für jede

Frequenz bestimmt werden. Liegen z.B. von zehn 100 %-Linien Absorbanzwerte bei der Wellenzahl 1000 cm^{-1} vor, so ergibt sich das quadratische Mittel für die Wellenzahl 1000 cm^{-1} aus diesen zehn Werten.

Bei [BL12] hingegen wird zur Charakterisierung eines QCL-Spektrometers wie in der vorliegenden Arbeit verfahren, indem das quadratische Mittel frequenzunabhängig aus allen Werten einer einzelnen 100 %-Linie berechnet wird. Zudem ist das bei [YKLB15] vorgeschlagene frequenzabhängige Verfahren in der vorliegenden Arbeit in dieser Form nicht anwendbar: In Abschnitt 3.2.2 wurde die Eigenschaft des verwendeten Lasers genannt, dass bei schnellen Durchstimmgeschwindigkeiten keine genaue Zuordnung der Wellenzahlen möglich ist. Wie in Abbildung 3.16 gezeigt, werden einem Spektrum im Rahmen der vorliegenden Arbeit daher Wellenzahlen mithilfe bekannter spektraler Eigenschaften zugeordnet. Da die 100 %-Linien solche spektralen Eigenschaften im Gegensatz z.B. zu einem Gewebespektrum nicht zeigen, ist die Zuordnung der Wellenzahlen bei 100 %-Linien in dieser Form nicht möglich. Es können daher zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommene 100 %-Linien nicht frequenzabhängig miteinander verglichen werden.

Aufgrund der erwähnten Beobachtung, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Frequenzabhängigkeit der in Abbildung 3.21a gezeigten Oszillationen beobachtet wurde¹⁴, wird an dieser Stelle davon ausgegangen, dass es sich bei den Oszillationen um Rauschen oder zumindest ein rauschähnliches Phänomen handelt. Unterstützt wird dies durch die Annahme, dass die für die Oszillationen vermutlich verantwortlichen Ursachen wie Variationen der Gitterdrehgeschwindigkeit oder Laserintensitätsschwankungen mehr oder weniger zufällig auftreten.

Signalunabhängiges Rauschen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, dass zwei zentrale Einflüsse das in Abbildung 3.21 gezeigte Rauschen hervorrufen: Zum einen die erwähnten Laserschwankungen (signalabhängiges Rauschen), zum anderen Datenerfassungsrauschen (signalunabhängiges Rauschen).

Um den dominierenden dieser beiden Einflüsse und somit Verbesserungspotenzial zu ermitteln, wurde die Relation der beiden Einflüsse abgeschätzt. Dazu wurden folgende Schritte unternommen:

¹⁴Ausnahme bilden die Übergängen zwischen den Kavitäten. Da dort vermutlich starke Variationen der Gitterdrehgeschwindigkeiten und im Vergleich zur Laserleistung hohe Intensitätsschwankungen vorliegen, kommt es in diesen Bereichen zu deutlich höherem Rauschen als in den restlichen Bereichen. Diese Randbereiche werden in der vorliegenden Arbeit in der Datenverarbeitung jedoch entfernt, wodurch die z.B. in den Abbildungen 3.16 und 3.20 gezeigten spektralen Lücken in den Bereichen der Kavitätswechsel zustande kommen.

1. Simultane Aufnahme zweier Einkanalspektren $I_{0,D1}$ und $I_{0,D2}$ mit den Detektoren D1 und D2 bei *offenem* Laserausgang, d.h. simultane Aufnahme von zwei Laserkurven in den beiden Strahlengängen.
2. Sequentielle Aufnahme (M1, M2) von zwei zweikanaligen (D1, D2) Einkanalspektren $I_{R,M1D1}$, $I_{R,M1D2}$, $I_{R,M2D1}$ und $I_{R,M2D2}$ bei *geschlossenem* Laserausgang, um das laserabhängige Rauschen zu erfassen. Dieses Rauschen wird im Folgenden als „Datenerfassungsrauschen“ bezeichnet.
3. Addition des gemessenen Datenerfassungsrauschens mit der bei Schritt 1 aufgenommenen Laserkurve des gleichen Detektorkanals (z.B. $I_{0,D1} + I_{R,M1D1}$). Durch Verwendung der jeweils selben Laserkurve wird eine ideale Strahlungsquelle simuliert, die sich von Messung M1 zur nächsten Messung M2 nicht ändert. Dadurch wird der Einfluss des laserverursachten Rauschens eliminiert.
4. Übertrag des Datenerfassungsrauschens in den logarithmischen Absorbanzraum durch Anwendung folgender Gleichung¹⁵ (vgl. Gleichung (3.1)):

$$A_{\text{Datenerfassung}} = \log_{10} \left(\frac{I_{0,D1} + I_{R,M1D1}}{I_{0,D1} + I_{R,M2D1}} \cdot \frac{I_{0,D2} + I_{R,M2D2}}{I_{0,D2} + I_{R,M1D2}} \right) \quad (3.20)$$

Abbildung 3.22a zeigt beispielhaft eine auf diese Weise ermittelte 100 %-Linie. Für den Vergleich mit der Gesamtrauschlinie wurde die signalunabhängige Linie demselben Tiefpass unterzogen wie die in Abbildung 3.21 gezeigten Messungen. Im Rahmen der Untersuchung wurden zehn der in Abbildung 3.22a gezeigten Kurven aufgenommen, die in Abbildung 3.22b in Form von Boxplots zusammengefasst sind.

Abbildung 3.22 zeigt somit, dass der Einfluss des Datenerfassungsrauschens zwar eine Rolle spielt, aber nur einen kleinen Anteil am Gesamtrauschen hat und somit anderen Störeinflüssen wie Laserintensitätsschwankungen, Strahlageinstabilitäten, Variationen der Gitterdrehgeschwindigkeit, Temperaturveränderungen im Raum oder atmosphärischen Veränderungen tendenziell untergeordnet ist. Ähnliche Ergebnisse finden sich bei [YKLB15]. Es ist daher zu erwarten, dass die Verwendung von Detektorsystemen mit einer höheren Sensitivität die Spektrometersensitivität nicht wesentlich verbessert.

¹⁵Das Signal des ersten Detektors wird hier der Vollständigkeit halber mit dem des zweiten referenziert, obwohl das Rauschen des ersten Detektors unabhängig von dem des zweiten ist und die Laserkurven der beiden Messungen identisch sind.

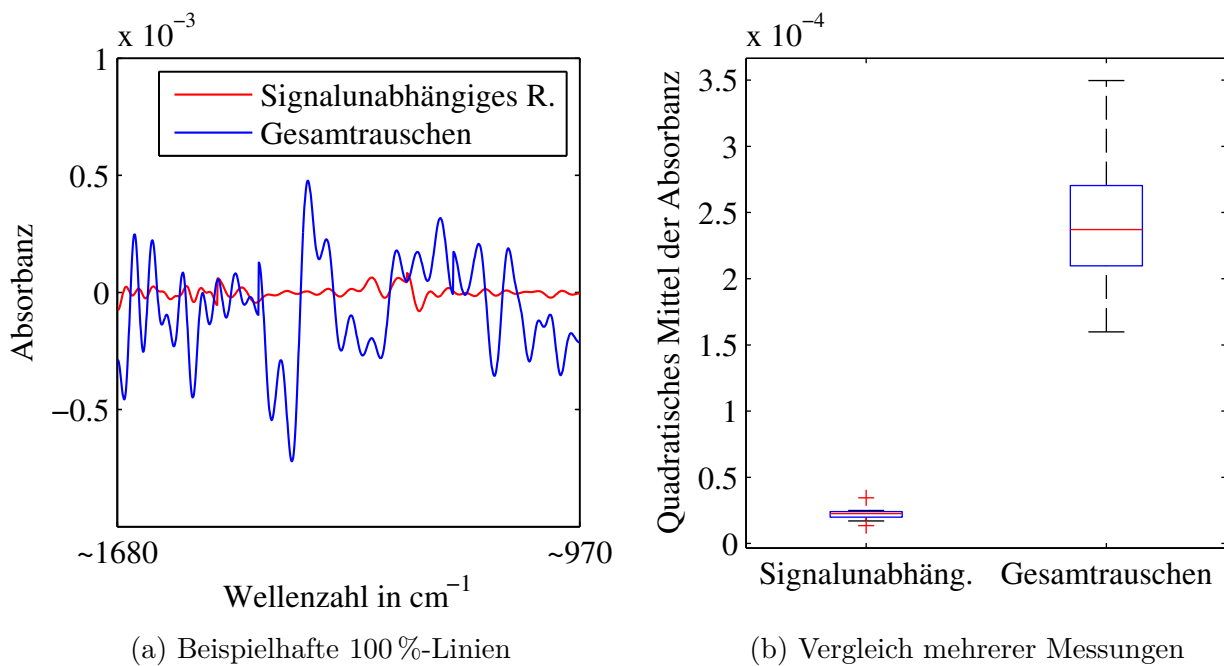


Abbildung 3.22: (a) Beispielhafte durch Dunkelstromrauschen verursachte 100 %-Linie (signalunabhängiges Rauschen) im Vergleich mit einer 100 %-Linie bei Bildgebung (Gesamtrauschen, vgl. Linie „(A)“ in Abbildung 3.21a); (b) zehn Messungen des signalunabhängigen Rauschens im Vergleich mit Messungen des Gesamtrauschens (vgl. Boxplot „(A)“, Bildgebung in Abbildung 3.21b).

4 Ergebnisse der Gewebedifferenzierung durch hyperspektrale Bildgebung

4.1 Computergestützte Simulation des Einflusses von Wasserschichtdickenvariation

4.1.1 Ziel der Simulation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, dass sich während der Messung von feuchtem Gewebe trotz Wasserverdrängung durch den ATR-Kristall eine entsprechend dünne Wasserschicht zwischen Kristall und Gewebe befindet. Eine örtliche Dickenvariation dieser Wasserschicht wird hier neben dem in Abschnitt 3.7.3 untersuchten Rauschen als zweite zentrale Störgröße der Gewebemessungen gesehen; beispielsweise könnte eine bestimmte Wasserschichtdicke an einem bestimmten Ort einen tumorösen Bereich suggerieren, obwohl sich dort gesundes Gewebe befindet. Anhand der Simulation wird die Auswirkung solcher Wasserschichtdickenvariationen auf die Gewebeunterscheidung untersucht.

Zentrales Ziel der Simulation ist daher eine Aussage darüber, wie groß der spektrale Unterschied zwischen gesundem und tumorösem Gewebe sein muss, damit eine Unterscheidung durch den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Aufbau trotz Wasserschichtdickenvariation möglich ist.

4.1.2 Konzeptionelles Modell: Beschreibung abgeschwächter Totalreflexion durch komplexen Brechungsindex

Transmissions- und Transflexionsspektren (s. Abschnitt 2.4.2) von Gewebeschnitten zeigen teilweise nicht nur Absorptions-, sondern auch Streueffekte [MRDB05, RD05, BBB⁺09, BMD10, BSK⁺12, SK13]. Der Grund dafür sind nach [BBB⁺09] beispielsweise Zellkerne, deren Durchmesser mit ca. 5 bis 6 μm in der Größenordnung der Wellenlängen des mittleren Infrarotbe-

reichs liegen und somit *Mie-Streuung* verursachen. Durch entsprechende Datenverarbeitung ist es möglich, die Effekte dieser Einflüsse zu reduzieren [MRDB05, RD05, BSK⁺12, BMD10].

Nach [EM13] existiert Streuung auch bei Verwendung von ATR, ist aber, vor allem bei ATR-Gewebeuntersuchungen, in der Praxis vernachlässigbar [EM13, GSBES10, BSLG13, SK13, Mil13] [Mil12, S. 199 ff.].

Ein ATR-Gewebespektrum beruht aus diesem Grund praktisch ausschließlich auf Absorption und kann somit durch das Beer'sche Gesetz (s. Abschnitt 2.1.3) beschrieben werden. Im Rahmen der Simulation werden ATR-Gewebespektren daher mithilfe komplexer Brechungsindizes (s. Abschnitt 2.4.1) modelliert, Streuung wird nicht berücksichtigt.

Abbildung 4.1a zeigt die für die Simulation verwendete Modellvorstellung. Es wird angenommen, dass das zu modellierende System aus folgenden drei Schichten besteht:

1. Einem ATR-Kristall als erster Schicht. Diese Schicht weist einen realen Brechungsindex auf, da die Absorption für das verwendete Material vernachlässigt werden kann (s. Abschnitt 2.4.1).
2. Einer Wasserschicht, die durch einen komplexen Brechungsindex und die Wasserschichtdicke beschrieben wird. Die Dicke variiert dem Simulationsziel entsprechend.
3. Einer Gewebeschicht, die entweder aus tumorösem oder gesundem Gewebe besteht. Die Unterschiede zwischen den Gewebearten werden durch unterschiedliche komplexe Brechungsindizes beschrieben. Da frisches, natives Gewebe simuliert wird, enthält das Gewebe neben reiner Gewebe- auch Wasserinformation.

4.1.3 Mathematisches Modell: Abgeschwächte Totalreflexion an einer Dreifachschicht

Analytische Beschreibung durch erweiterte Fresnel-Koeffizienten

Gleichungen (2.25) und (2.26) in Abschnitt 2.4.1 beschreiben die Reflektivität R_{12} für den Fall zwei aneinander grenzender Medien. Basierend auf den dort verwendeten Fresnel-Formeln kann die Reflektivität R_{123} nach Gleichung (4.1) für den Fall drei aneinander grenzender Medien berechnet werden [Yeh05, S. 66, S. 87] [Mil12, S. 98 ff.].

Die Variable d bezeichnet dabei die Dicke der mittleren Schicht (Wasserschicht, s. Abbildung 4.1a), $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl und n den jeweiligen komplexen Brechungsindex. Die Größe ρ ergibt sich aus der mit den Gleichungen (4.2) bis (4.5) gezeigten Herleitung. Grundlage für diese Herleitung ist Abbildung 4.1b. Der Wert ρ beschreibt die Summe der dort gezeigten re-

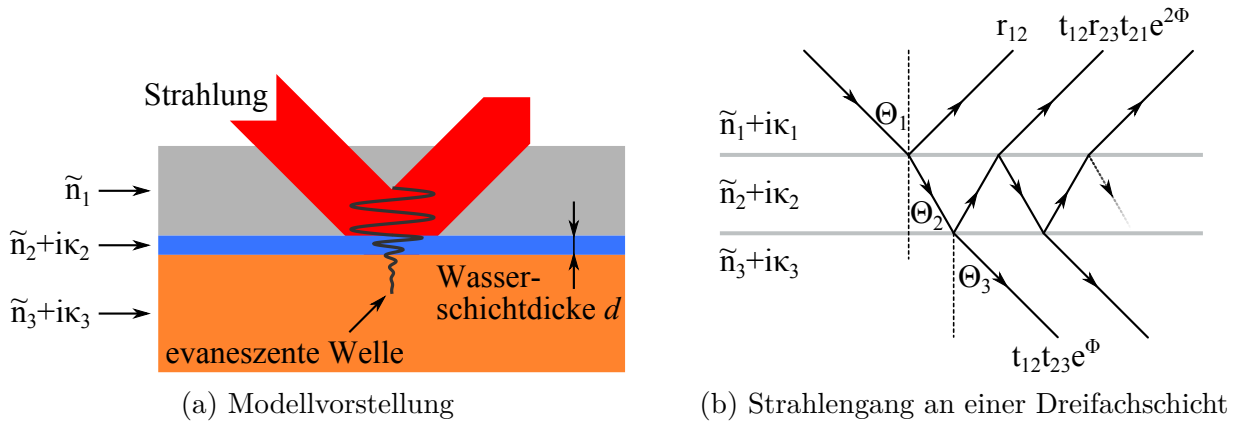


Abbildung 4.1: (a) Der Simulation zugrunde liegende Modellvorstellung: Im ATR-Kristall mit Brechungsindex $n_1 = \tilde{n}_1$ wird die Laserstrahlung totalreflektiert; die evaneszente Welle befindet sich im Bereich der Wasserschicht mit Brechungsindex $n_2 = \tilde{n}_2 + i\kappa_2$ und im Bereich des Gewebes mit Brechungsindex $n_3 = \tilde{n}_3 + i\kappa_3$; der Einfluss der Wasserschichtdickenvariation wird im Rahmen der Simulation untersucht. (b) Darstellung reflektierter und transmittierter Strahlung an einer Dreifachschicht. Mit „r“ werden Fresnel-Reflexionskoeffizienten bezeichnet, mit „t“ Transmissionskoeffizienten. Die Größe ϕ bezeichnet die Phasenverschiebung aufgrund optischer Weglängenunterschiede, Θ die jeweiligen Einfall- bzw. Brechungswinkel.

flektierten Strahlen.

In den Gleichungen (4.2) bis (4.5) ist ϕ die Phasenverschiebung nach Gleichung (4.6), die aufgrund des optischen Weglängenunterschieds zwischen zwei aufeinanderfolgenden reflektierten oder transmittierten Strahlen entsteht [Yeh05, S. 87] [Mil12, S. 99]. Die Umformung in Gleichung (4.6) ist analog zu der in den Gleichungen (2.25) und (2.26) gezeigten. Der Schritt von Gleichung (4.4) zu (4.5) geschieht unter Verwendung des Grenzwerts der unendlichen geometrischen Reihe $\sum_{k=0}^{\infty} a_0 q^k = a_0 / (1 - q)$, der für $|q| < 1$ gilt [BSMM06, S. 19, S. 422].

Grundlage der Umformung in Gleichung (4.5) sind die bei [Yeh05, S. 66] beschriebenen Eigenschaften der Fresnel-Koeffizienten $r_{21} = -r_{12}$ und $t_{12}t_{21} - r_{12}r_{21} = 1$.

$$R_{123} = |\rho|^2 = \left| \frac{r_{12} + r_{23} e^{4\pi i \tilde{\nu} d \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}}}{1 + r_{12} r_{23} e^{4\pi i \tilde{\nu} d \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}}} \right|^2 \quad (4.1)$$

$$\rho = r_{12} + t_{12}r_{23}t_{21}e^{2\phi} + t_{12}r_{23}r_{21}r_{23}t_{21}e^{4\phi} + \dots = \quad (4.2)$$

$$= r_{12} + \left(t_{12}r_{23}t_{21}e^{2\phi}\right) \left(r_{21}r_{23}e^{2\phi}\right)^0 + \left(t_{12}r_{23}t_{21}e^{2\phi}\right) \left(r_{21}r_{23}e^{2\phi}\right)^1 + \dots = \quad (4.3)$$

$$= r_{12} + \sum_{k=0}^{\infty} \left(t_{12}r_{23}t_{21}e^{2\phi}\right) \left(r_{21}r_{23}e^{2\phi}\right)^k = \quad (4.4)$$

$$= r_{12} + \frac{t_{12}r_{23}t_{21}e^{2\phi}}{1 - r_{21}r_{23}e^{2\phi}} = \frac{r_{12} + r_{23}e^{2\phi}}{1 + r_{12}r_{23}e^{2\phi}} \quad (4.5)$$

$$\phi = 2\pi i n_2 \tilde{\nu} d \cos \Theta_2 = 2\pi i \tilde{\nu} d \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1} \quad (4.6)$$

Für die Reflexionskoeffizienten r_{12} und r_{23} in Gleichung (4.1) können je nach Anwendungsfall sowohl die Koeffizienten für senkrecht (σ) als auch die für parallel (π) polarisierte Strahlung eingesetzt werden. Die Koeffizienten r_{12}^{σ} und r_{12}^{π} sind in den Gleichungen (2.25) bzw. (2.26) gezeigt. Gleichung (4.7) zeigt beispielhaft r_{23}^{σ} für senkrecht polarisierte Strahlung, r_{23}^{π} ergibt sich entsprechend.

$$r_{23}^{\sigma} = \frac{n_2 \cos \Theta_2 - \sqrt{n_3^2 - n_2^2 \sin^2 \Theta_2}}{n_2 \cos \Theta_2 + \sqrt{n_3^2 - n_2^2 \sin^2 \Theta_2}} = \frac{\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1} - \sqrt{n_3^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}}{\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1} + \sqrt{n_3^2 - n_1^2 \sin^2 \Theta_1}} \quad (4.7)$$

Die in Gleichung (4.7) gezeigte Umformung entspricht ebenfalls der in den Gleichungen (2.25) und (2.26) verwendeten. Analog zu Abschnitt 2.4.1 ist der Grund für diese Umformung, dass so die Reflektivität in Bezug auf Winkel ausschließlich in Abhängigkeit von Θ_1 ausgedrückt werden kann. Dadurch ist es möglich, mit Gleichung (4.1) den Anteil der reflektierten Strahlung auch bei Totalreflexion zu berechnen, da in diesem Fall Θ_1 , nicht aber die anderen Winkel Θ_2 und Θ_3 bekannt sind.

Verifikation des analytischen Modells durch numerische Simulation

Zur Verifikation des beschriebenen analytischen Modells wurde das in Abbildung 4.2a gezeigte numerische Dreischichtmodell mithilfe des Programms COMSOL (Version 4.4, Comsol Multiphysics GmbH, Göttingen, D.) unter Verwendung des Moduls „Wave Optics“ implementiert. Dabei wurde prinzipiell in Anlehnung an das unter [Com14] beschriebene Verfahren vorgegangen.

Abbildung 4.2b zeigt den Vergleich zwischen dem im letzten Unterabschnitt beschriebenen analytischen Modell (Implementierung in MATLAB, Version R2007b, MathWorks) und dem numerischen Modell für unterschiedliche Polarisierungen und Einfallswinkel. Die Übereinstimmung zeigt, dass das analytische Modell korrekt zur Beschreibung des in Abbildung 4.1a gezeigten Modells im Falle von Totalreflexion verwendet werden kann. Für die Simulation wurde aufgrund

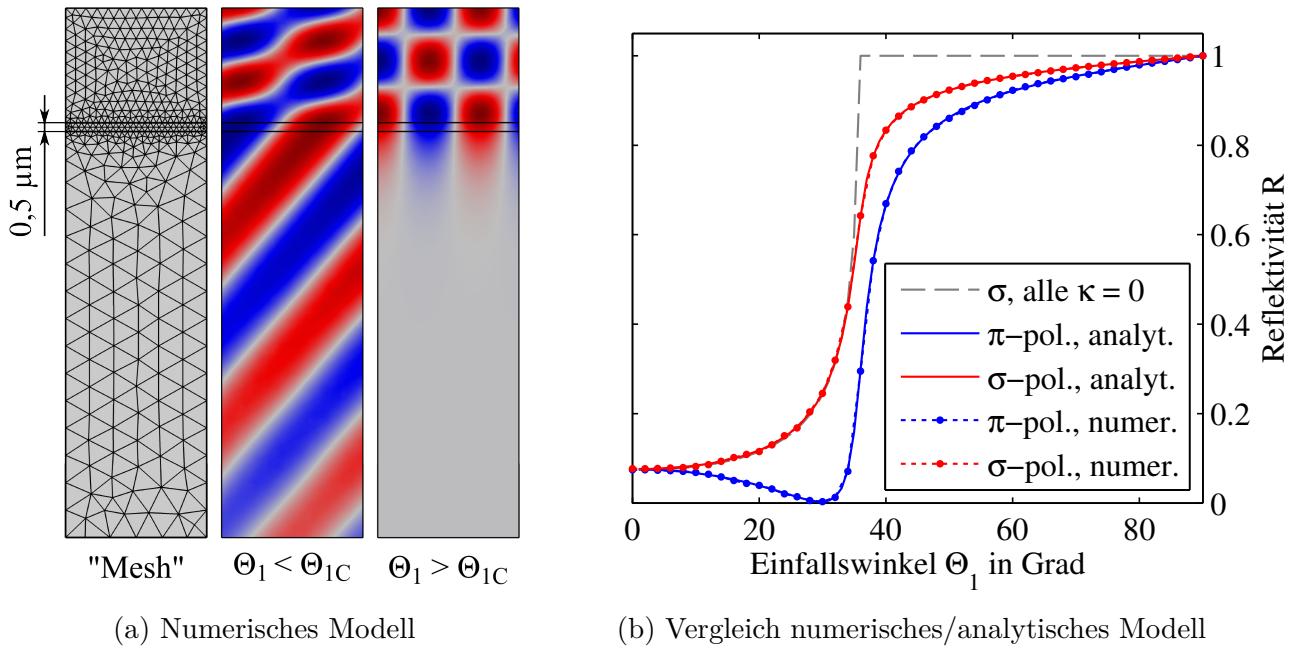


Abbildung 4.2: Verifikation des analytischen Modells durch numerische Simulation. (a) In COMSOL implementiertes numerisches Modell für elektromagnetische Strahlung am Übergang von drei Schichten; gezeigt sind das Netz der finiten Elemente („Mesh“), der Fall für gebrochene Strahlung ($\Theta_1 < \Theta_{1C}$) und der Fall für Totalreflexion ($\Theta_1 > \Theta_{1C}$); im Fall von Totalreflexion ist die exponentiell abfallende evaneszente Welle zu erkennen; die matrixähnliche Struktur im einfallsseitigen Halbraum entsteht durch die Überlagerung von einfallendem und reflektiertem Feld. (b) Vergleich des numerischen mit dem analytischen Modell für unterschiedliche Polarisierungen (senkrecht-polarisiert (σ) und parallel-polarisiert (π)); als Parameter wurden beispielhaft verwendet $n_1 = 2,4$; $n_2 = 1,33 + i \cdot 0,04$; $n_3 = 1,4 + i \cdot 0,05$; $\tilde{\nu} = 1000 \text{ cm}^{-1}$ und $d = 0,5 \mu\text{m}$. Zudem ist beispielhaft für σ -polarisierte Strahlung der Fall für reale Brechungsindizes (alle $\kappa = 0$) gezeigt, d.h. der Fall, wenn keine Strahlung absorbiert wird.

der deutlich höheren Laufgeschwindigkeit das in MATLAB implementierte analytische Modell verwendet.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass das analytische Modell zwar auf dem in Abbildung 4.1b gezeigten Fall der Strahlbrechung basiert, das Modell aber für den Fall von Totalreflexion verwendet wird. Dies ist relevant, da bei Betrachtung von Wasser und Gewebe für den in Abbildung 4.1b gezeigten Fall nicht zwingend gerichtete Reflexion und Transmission in der zweiten und dritten Schicht für $\Theta_1 < \Theta_{1C}$ stattfindet. D.h. dieses Modell wäre im Falle dominierender Streuung nicht gültig. Bei Totalreflexion, d.h. $\Theta_1 \geq \Theta_{1C}$, kann die Streuung der evaneszenten Welle an dieser Stelle aber wie beschrieben vernachlässigt und daher das gezeigte Modell für den vorliegenden Fall verwendet werden.

4.1.4 Realisiertes Computermodell

Eingangsgrößen

Abbildung 4.3 zeigt das Flussdiagramm des Simulationsprogramms. Folgende Parameter werden vom Nutzer vorgegeben und sind somit Eingangsgrößen der Simulation:

- Grenzen der Wasserschichtdicke d_{min} und d_{max} : Aus diesem Intervall wird die Wasserschichtdicke d als Zufallswert für jedes Absorbanzspektrum gewählt. Jeder simulierte Ort erhält somit eine zufällig ausgewählte Wasserschichtdicke. Die Grenzwerte ergeben sich aus einer iterativen Annäherung der Simulationsergebnisse an reale Messungen¹, wie in Abschnitt 4.1.5 gezeigt.
- Anzahl N der simulierten Spektren: Beispielsweise können $N = 64$ Spektren simuliert werden, um die 64 Pixel des realisierten Messaufbaus zu simulieren.
- Unterschied zwischen tumorösem und gesundem Gewebe: Der Unterschied zwischen Tumor- und gesundem Gewebe wird modelliert durch eine im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöhte Absorption des Tumorgewebes bei einer bestimmten Wellenzahl $\tilde{\nu}_p$ bzw. Wellenlänge λ_p . Beschrieben wird dies durch den Faktor $C_{t/g}$ nach Gleichung (4.8), mit α als Absorptionskoeffizient (s. Abschnitt 2.1.3).

$$C_{t/g} = \frac{\alpha_{tumor}(\tilde{\nu}_p)}{\alpha_{gesund}(\tilde{\nu}_p)} \quad (4.8)$$

Diese Eingangsgröße ist gleichzeitig eine Ergebnisgröße, da für einen bestimmten eingestellten Gewebeunterschied $C_{t/g}$ die Aussage getroffen werden kann, wie gut die beiden Gewebearten unterschieden werden können, wenn z.B. eine bestimmte Wasserschichtdickenvariation und ein bestimmtes Rauschlevel vorliegen.

- Wasseranteil des Gewebes x_{wasser} , der den prozentualen Wasseranteil des Gewebes beschreibt. Dieser Wert wird der Literatur entnommen [JCW⁺95, KS06, BGM⁺03].
- Rauschgrenzen Ra_{min} und Ra_{max} : Aus diesem Intervall wird das Rauschen als Zufallswert für jedes Absorbanzspektrum gewählt. Das Intervall und die Rauschbandbreite werden durch die in Abschnitt 3.7.3 beschriebenen Messungen bestimmt.
- Einfallswinkel Θ_1 . Dieser ergibt sich aus dem Spektrometeraufbau zu $\Theta_1 \approx 45^\circ$.

¹Eine direkte Messung der Wasserschichtdicke wäre mit sehr hohem Aufwand verbunden, nach [BGM⁺03] ist sogar keine Methode zur quantitativen Bestimmung der Wasserschichtdicke verfügbar.

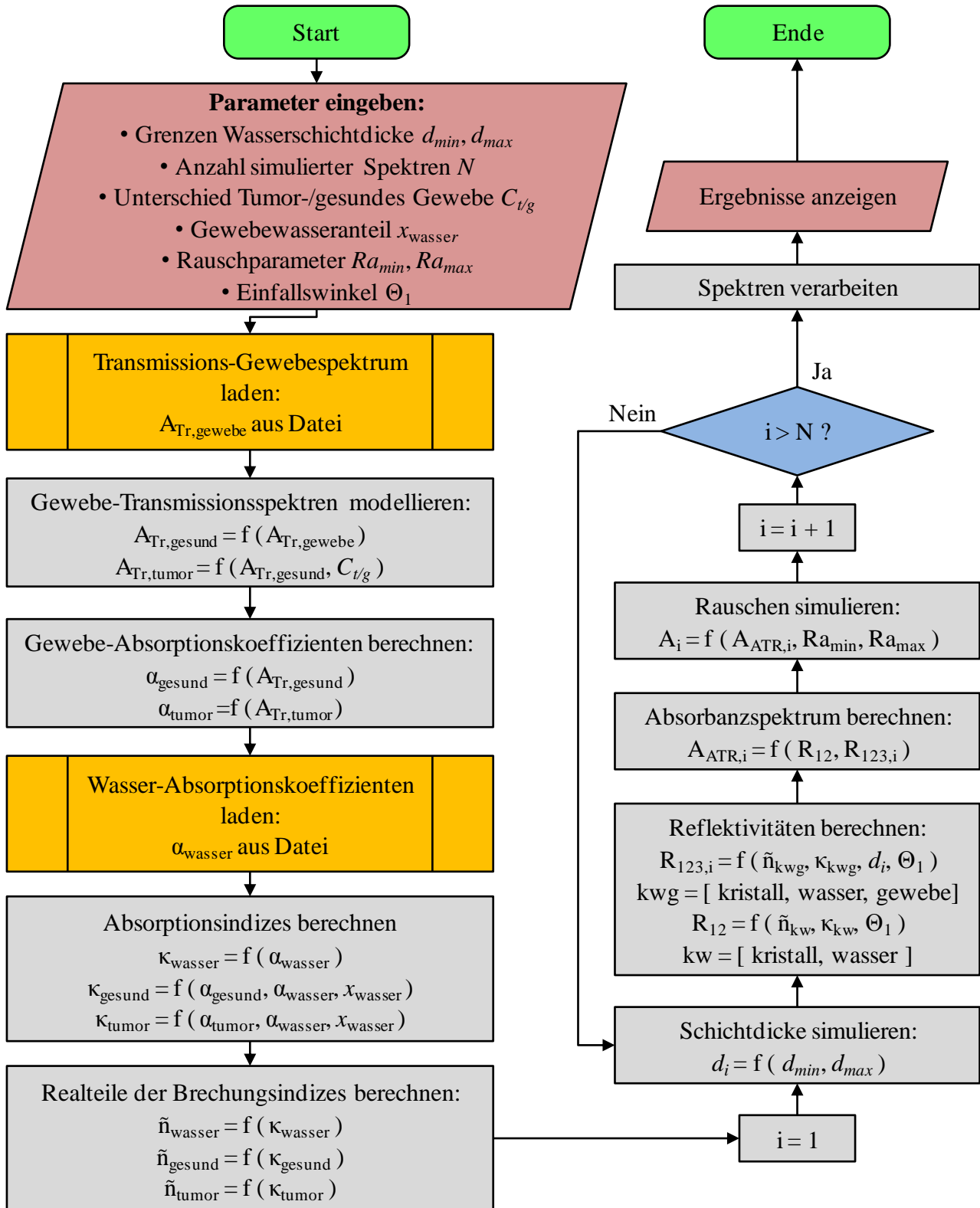


Abbildung 4.3: Modellierung von Gewebe- und Wassereigenschaften (linker Pfad von oben nach unten) und Ablauf der Simulation spektraler Bildgebung (rechts von unten nach oben).

Modellierung von Wasser- und Gewebeeigenschaften

Ausgangspunkt der Gewebemodellierung ist ein ATR-Spektrum, dessen Form manuell Transmissionspektren (von getrocknetem Gewebe) aus der Literatur [LHL⁺02] angepasst wurde²; das Ergebnis ist in Abbildung 4.4a gezeigt. Die Transmissions-Absorbanzwerte wurden ebenfalls der Literatur entnommen³.

Als Unterschied zwischen gesundem und tumorösem Gewebe wurde beispielhaft eine erhöhte Absorption bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} für das Tumorgewebe modelliert. Der Peakwert des gesunden Spektrums wird bei dieser Wellenzahl mit dem genannten Faktor $C_{t/g}$ multipliziert, um den dortigen Peakwert des Tumorspektrums zu erhalten.

Es wird an dieser Stelle die Absorption bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} zur Unterscheidung herangezogen, da dieser Bereich auch bei der experimentellen Gewebeunterscheidung in Abschnitt 4.2 eine zentrale Rolle spielt. In den übrigen Bereichen werden im Rahmen der Simulation die Spektren von tumorösem und die von gesundem Gewebe als identisch angenommen.

Durch Umstellung des in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen Beer'schen Gesetzes kann nach Gleichung (4.9) der wellenzahlabhängige Absorptionskoeffizient α aus der Transmissions-Absorbanz A_{Tr} berechnet werden. Für die Gewebespektren ist das Ergebnis dieser Berechnung in Abbildung 4.4b gezeigt.

$$\alpha(\tilde{\nu}) = \frac{A_{Tr}(\tilde{\nu})}{d \cdot \log_{10}(e)} \quad (4.9)$$

Der Absorptionskoeffizient für Wasser ist bei [YWMG87] veröffentlicht und wird daher an dieser Stelle nicht über den Umweg des Beer'schen Gesetzes berechnet. Für die Spektrenform wurde ein selbst gemessenes Spektrum verwendet.

Aus den Absorptionskoeffizienten lässt sich der Absorptionsindex, d.h. der Realteil des Brechungsindex berechnen (s. Abschnitt 2.4.1). Für κ_{wasser} geschieht dies nach folgender Gleichung:

$$\kappa_{wasser} = \frac{\alpha_{wasser}}{4\pi\tilde{\nu}} \quad (4.10)$$

²Die genaue Form des Ausgangs-Gewebespektrums ist für die Simulation nicht unmittelbar relevant, daher erfolgte nur eine ungefähre manuelle Formanpassung.

³Es werden die bei [YOG⁺00] beschriebenen Absorbanzwerte verwendet. Dort wurde in Transmission bei der Wellenzahl 1400 cm^{-1} eine Absorbanz von ca. $A = 0,14$ bei einer Gewebeschnittdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ gemessen. Bei [Las99, S. 35, S. 98] wurden bei der gleichen Wellenzahl vergleichbare bis etwas höhere Werte bei einer Schnittdicke von $6\text{ bis }8\text{ }\mu\text{m}$ gemessen, bei [CHW⁺03] sind höhere Werte bis $A = 0,3$ für eine Schnittdicke von $8\text{ }\mu\text{m}$ gezeigt. Auch bei [MJGK08] werden höhere Werte bis $A = 0,25$ bei Schnittdicken von lediglich $3\text{ bis }4\text{ }\mu\text{m}$ beschrieben. Die bei [MJGK08] verwendeten Spektren zeigen allerdings Streuartefakte, die z.B. bei [BMD10] beschrieben werden. Bei [YOG⁺00] sind diese Artefakte nicht zu erkennen. Im überwiegenden Teil der in Abschnitt 1.4 beschriebenen Publikationen sind keine unnormierten Werte gezeigt. Es werden daher die bei [YOG⁺00] beschriebenen Werte verwendet, auch, da diese im Vergleich zu den anderen Publikationen eher niedrig sind. Es handelt sich im Rahmen der Modellierung somit um eine tendenziell konservative Rechnung, da bei höheren Gewebeabsorptionswerten auch eine leichtere Unterscheidung zwischen den Gewebearten möglich wäre, aufgrund des in diesem Fall sinkenden Wassereinflusses.

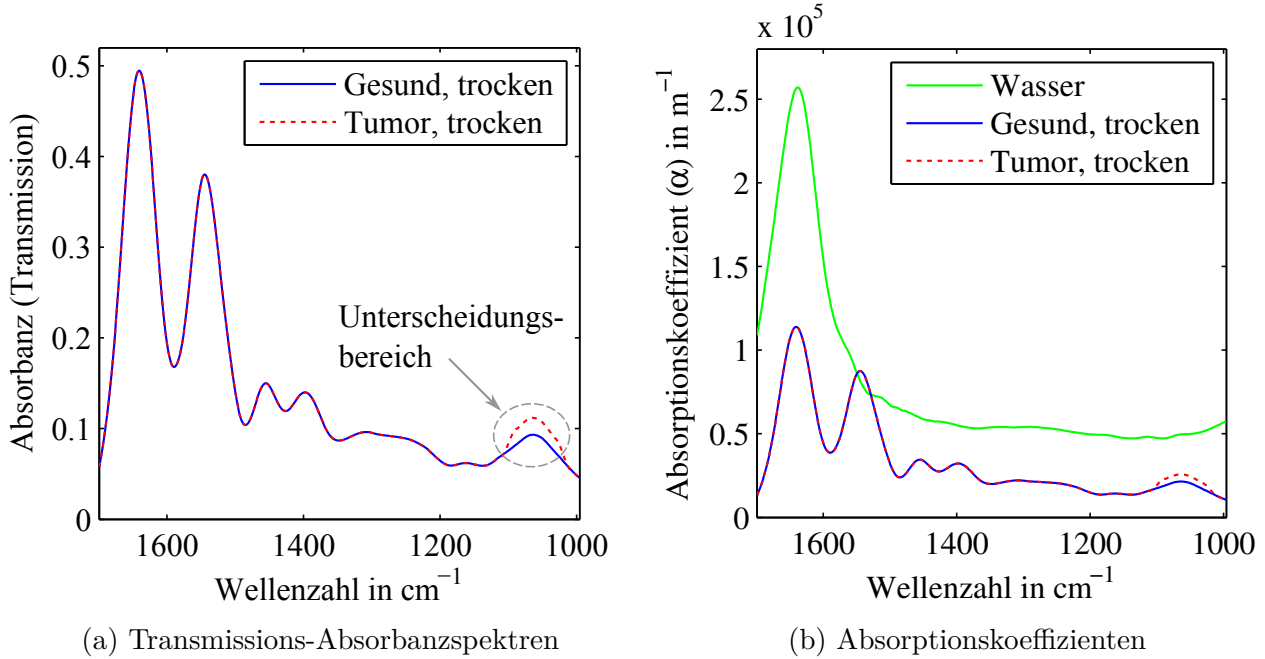


Abbildung 4.4: (a) Modell von in Transmission gemessenen Absorbanzspektren trockenem Gewebe; die Form des Spektrums gesunden Gewebes ist angelehnt an [LHL⁺02], die Absorbanzwerte an [YOG⁺00] (für eine Gewebeschnittdicke von $10\ \mu\text{m}$). Die Modellierung des Spektrums trockenem Tumorgewebes erfolgt durch eine Erhöhung der gekennzeichneten Absorptionsbande; in diesem Beispiel ist das Maximum der Bande um 20 % gegenüber dem gesunden Gewebe erhöht ($C_{t/g} = 1, 2$). Auf Grundlage dieser modellierten Spektren lassen sich Gewebeeigenschaften berechnen, wie in (b) gezeigt. Dort sind Gewebeabsorptionskoeffizienten dargestellt, die aus den in (a) gezeigten Transmissions-Absorbanzspektren berechnet wurden; die Wasserabsorptionskoeffizienten der gezeigten Wasserkurve wurden entnommen aus [YWMG87].

Ähnlich dazu wird κ_{gewebe} nach Gleichung (4.11) berechnet. Wie zu sehen, wird jedoch für das Gewebe neben α_{tumor} bzw. α_{gesund} auch α_{wasser} verwendet, um feuchtes Gewebe zu modellieren. Der Wert x_{wasser} bezeichnet dabei den Wasseranteil im Gewebe⁴. Für den Wassergehalt wird $x_{\text{wasser}} = 0,75$ verwendet⁵. Die berechneten Absorptionsindizes κ sind in Abbildung 4.5a

⁴Es wird die Summe aus Wasserinformation und Gewebeeinformation gebildet und kein anteiliger Wert. Der Grund dafür ist, dass sich die bei [YOG⁺00] angegebene Gewebeschnittdicke von $10\ \mu\text{m}$ auf die Dicke im Mikrotom direkt nach dem Schockfrostentziehen bezieht. Die Dicke, auf deren Grundlage die Absorptionskoeffizienten α berechnet wurden, beschreibt also den hydrierten Zustand. Gemessen wird das Gewebe allerdings in getrocknetem Zustand. Der eventuelle Effekt eigentlich höherer Absorptionskoeffizienten aufgrund einer eigentlich dünneren Schnittdicke in getrocknetem Zustand wird hier bei der Berechnung der Absorptionsindizes κ wieder aufgehoben, indem die volle Gewebeeinformation und die anteilige Wasserinformation addiert werden. Im Rahmen der Arbeit war zudem zu beobachten, dass das Gewebe sein Volumen nicht proportional zum Trocknungsgrad ändert, d.h. auch die gezeigten Absorptionskoeffizienten dürften bis zu einem gewissen Grad den realen Werten entsprechen.

⁵Bei [JCW⁺95] wird in Gehirngewebe ein Wassergehalt zwischen 70 % und 80 % angegeben, ähnliche Werte finden sich bei [KS06]. Bei [BGM⁺03] wird für Darmgewebe ein Wassergehalt von 77 % angegeben.

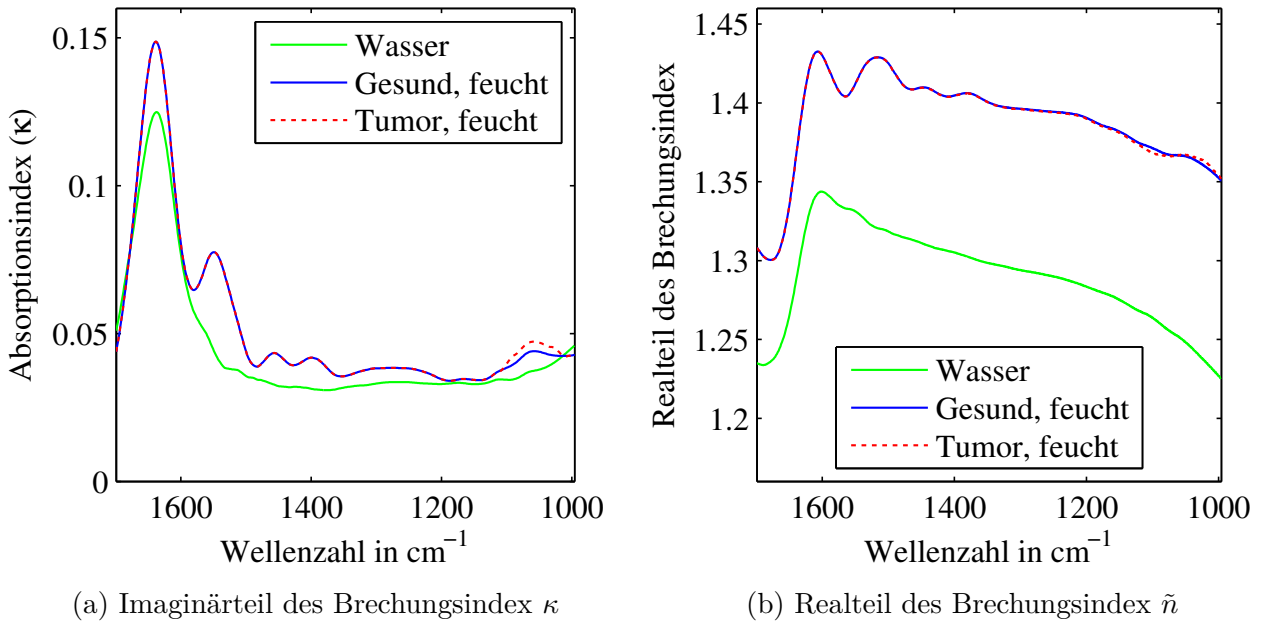


Abbildung 4.5: (a) Imaginärteile der Brechungsindizes κ für Wasser und die beiden feuchten Gewebearten. Die Werte für κ sind im gezeigten Bereich höher als für Wasser, da auch die Wasserinformation im feuchten Gewebe enthalten ist. (b) Die aus den jeweiligen Absorptionsindizes mittels Kramers-Kronig-Relation berechneten Realteile der Brechungsindizes.

gezeigt.

$$\kappa_{\text{gewebe}} = \frac{\alpha_{\text{gewebe}}}{4\pi\tilde{\nu}} + x_{\text{wasser}} \frac{\alpha_{\text{wasser}}}{4\pi\tilde{\nu}} \quad (4.11)$$

Aus dem Imaginärteil κ des Brechungsindex (Absorptionsindex) lässt sich unter Verwendung der *Kramers-Kronig-Relation* der Realteil \tilde{n} des Brechungsindex annähern [Mil12, S. 184] [GH07, S. 279 ff.]. Die Berechnung erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe eines bei [OI88] beschriebenen Algorithmus⁶. Abbildung 4.5b zeigt den auf diese Weise berechneten Realteil für Gewebe und Wasser⁷.

Modell der Wasserschichtdickenvariation und des Rauscheinflusses

Wasserschichtdickenvariation

Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, werden nach der Modellbildung von Wasser und Gewebe in

⁶Es wurde der dort beschriebene auf „Maclaurin’s Formula“ beruhende Algorithmus verwendet. Der Wert $\tilde{n}(\infty)$ wurde der Literatur entnommen und beträgt demnach für Wasser näherungsweise $\tilde{n}_{\text{wasser}}(\infty) = 1,33$ [Jac13, Seg81] und für ungetrocknetes Gewebe näherungsweise $\tilde{n}_{\text{gewebe}}(\infty) = 1,4$ [DKD05] (Der Wert für getrocknetes Gewebe liegt bei etwa $\tilde{n}_{\text{gewebe,trocken}}(\infty) = 1,5$ [Jac13], allerdings wird an dieser Stelle mit $\tilde{n}_{\text{gewebe}}$ feuchtes Gewebe modelliert.)

⁷Für die Berechnung wurde, um eine höhere Genauigkeit zu erreichen, ein größerer Spektralbereich als der gezeigte verwendet (Bereich zwischen 4000 cm^{-1} und 600 cm^{-1})

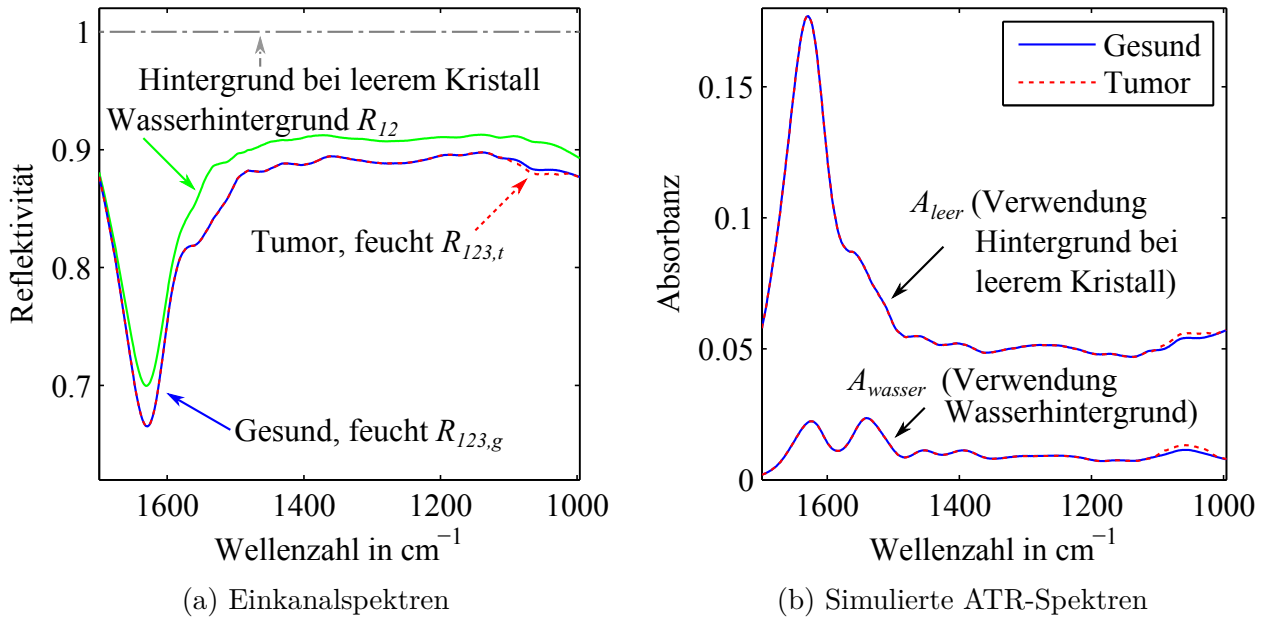


Abbildung 4.6: Simulierte Einkanalspektren; (a) „Hintergrund bei leerem Kristall“ beschreibt die Simulation eines Hintergrundspektrums ohne Wasser oder Probe auf dem Kristall. „Wasserhintergrund“ beschreibt die Simulation eines Hintergrundspektrums mit Wasser auf dem Kristall; dies entspricht einer Zweifachschicht Kristall/Wasser und somit R_{12} . R_{123} beschreibt ein Probenspektrum, d.h. die Simulation des Einkanalspektrums einer Dreifachschicht Kristall/Wasser/Gewebe. Der hier verwendete reale Brechungsindex des ATR-Kristalls beträgt $n_1 = \tilde{n}_1 = 2,4$; der Einfallswinkel beträgt $\Theta_1 = 45^\circ$, die Wasserschichtdicke $d = 0,6 \mu\text{m}$. (b) Aus den in (a) gezeigten Einkanalspektren berechnete Absorbanzspektren für zwei verschiedene Hintergrundspektren. Die Gewebeformation wird bei Verwendung des Wasserhintergrundspektrums hervorgehoben.

einer Schleife der Einfluss unterschiedlicher Wasserschichtdicken sowie der Einfluss von Rauschen simuliert. Die Wasserschichtdicke wird für jedes Spektrum durch eine Zufallsfunktion (*randn*, MATLAB, MathWorks) aus dem vorgegebenen Intervall zwischen d_{\min} und d_{\max} bestimmt. Die Reflektivität R_{123} berechnet sich im Anschluss daran nach Gleichung (4.1), unter Verwendung komplexer Brechungsindizes. Es wird im Rahmen der Simulation ein Mittelwert aus den Reflektivitäten senkrecht- bzw. parallel polarisierter Strahlung verwendet, d.h. $R_{123} = (R_{123}^\sigma + R_{123}^\pi)/2$; identisch dazu wird für die im Folgenden beschriebene Reflektivität an einer Zweifachschicht Kristall/Wasser $R_{12} = (R_{12}^\sigma + R_{12}^\pi)/2$ verwendet. Abbildung 4.6a zeigt R_{12} sowie R_{123} beispielhaft für eine Wasserschichtdicke von $0,6 \mu\text{m}$.

Ein Absorbanzspektrum berechnet sich, wie in Abschnitt 2.1.3 gezeigt, zu $A = \log_{10}(I_H/I_P)$ mit I_H als Hintergrund- und I_P als Probenspektrum. Wie beschrieben wird das Probenspektrum durch das Hintergrundspektrum normiert, um den spektralen Einfluss von z.B. Strahlungsquel-

le oder optischen Elementen zu eliminieren. Aus diesem Grund sind für ein Absorbanzspektrum die Formen der Einkanalpektren (Hintergrund- bzw. Probenspektrum) in der Theorie nicht von Bedeutung, da die Formen aufgrund der Normierung keinen Einfluss auf das resultierende Absorbanzspektrum haben. Im Rahmen der Simulation wird daher aufgrund der Einfachheit das Hintergrundspektrum bei leerem (keine Wasserschicht oder Probe vorhanden) Kristall als konstante Linie bei dem Wert 1 über alle Wellenzahlen modelliert (s. Abbildung 4.6a). Die Größe R_{123} kann in diesem Fall als Probenspektrum verwendet werden, da die Differenz zwischen R_{123} und dem konstanten Hintergrundspektrum ausschließlich auf den Einfluss der Probe (Wasserschicht und Gewebe) zurückzuführen ist. Das Absorbanzspektrum A_{leer} , das auf der Verwendung eines bei leerem Kristall aufgenommenen (bzw. simulierten) Hintergrundspektrums beruht, berechnet sich dann nach Gleichung (4.12) und ist in Abbildung 4.6b gezeigt.

$$A_{leer} = \log_{10} \left(\frac{1}{R_{123}} \right) \quad (4.12)$$

Um den Einfluss des Wassers auf die Spektrenform zu verringern, kann die spektrale Wasserinformation in das Hintergrundspektrum integriert werden. Die einfachste Möglichkeit dies in der Praxis zu realisieren ist die Aufnahme des Hintergrundspektrums bei wasserbedecktem ATR-Kristall⁸. Ist das Wasserspektrum sowohl Teil von I_H als auch von I_P , wird die Wasserinformation bei der Berechnung der Absorbanz A bis zu einem gewissen Grad eliminiert und dadurch die Gewebeinformation hervorgehoben⁹.

Da im Rahmen der Simulation das ursprüngliche Hintergrundspektrum im Falle eines leeren ATR-Kristalls bei jeder Wellenzahl den Wert 1 aufweist (s. Abbildung 4.6a), entspricht das Hintergrundspektrum mit integrierter Wasserinformation der Größe R_{12} , d.h. der Reflektivität nach Gleichung (2.25) bzw. (2.26) an einer Zweifachschicht Kristall/Wasser. Das Absorbanzspektrum berechnet sich für diesen Fall nach Gleichung (4.13) und ist in Abbildung 4.6b gezeigt. Im Rahmen der Simulation wird A_{wasser} verwendet, da diese Größe die Gewebeinformation deutlicher zeigt als A_{leer} .

$$A_{wasser} = \log_{10} \left(\frac{R_{12}}{R_{123}} \right) \quad (4.13)$$

⁸Andere Ansätze verwenden z.B. Wasserbanden, die nicht mit spektraler Gewebeinformation überlagern, um den ungefähren Wassergehalt zu bestimmen und das Spektrum bezüglich der Wasserinformation entsprechend zu korrigieren [PWJ86, DTP89, RH97] [GH07, S. 201 ff.]. Im Spektralbereich des verwendeten QCL-Systems befindet sich an Stellen der Wasserinformation jedoch auch immer Gewebeinformation. Zudem wird die Messung durch die zusätzliche Aufnahme von Wasserspektren, die zur Korrektur verwendet werden, verlängert.

⁹Die Wasserinformation kann nicht vollständig eliminiert werden, da der Wassergehalt der Probe (feuchtes Gewebe und Wasserschicht) niedriger ist als der Wassergehalt reinen Wassers. Es kommt aus diesem Grund durch die Integration der Wasserinformation in das Hintergrundspektrum zu einer systematischen Überkompensation der Wasserinformation. Die Stärke der Überkompensation ist z.B. abhängig von der lokalen Wasserschichtdicke.

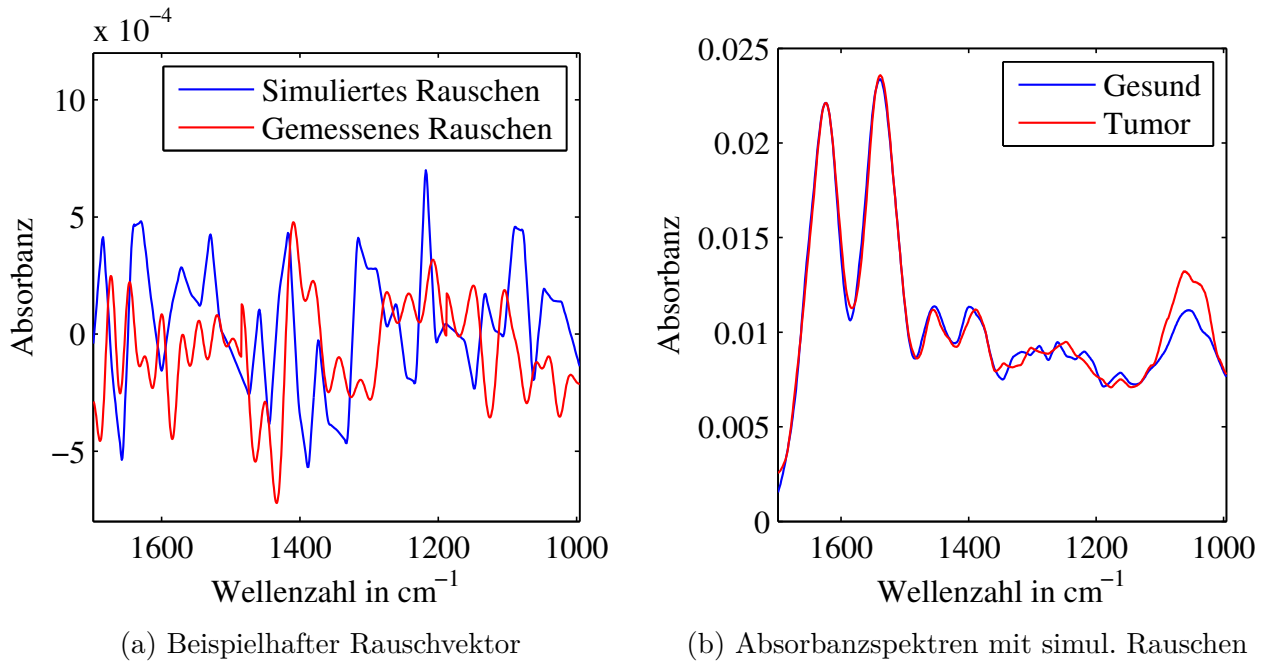


Abbildung 4.7: (a) Beispielhafter Vergleich zwischen simuliertem und gemessenem Absorbanzrauschen (s. Abschnitt 3.7.3). (b) Simuliertes ATR-Spektrum unter Berücksichtigung von Rauschen.

Unterschiedliche Stärken der Wasserinformation in unterschiedlichen Spektren können neben einer Wasserschichtdickenvariation auch aus unterschiedlichen Wassergehalten der unterschiedlichen Gewebearten resultieren. Manche Gewebearten haben einen höheren Wassergehalt als andere (s. z.B. [JCW⁺95, KS06]). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden diese Unterschiede allerdings als inhärente Gewebeunterschiede gesehen, die auch zur Gewebeunterscheidung herangezogen werden können. In der Simulation wird daher lediglich der gewebeunabhängige Faktor der Wasserschichtdickenvariation untersucht.

Rauscheinfluss

Neben der Störgröße „Wasserschichtdickenvariation“ wird in der Simulation als zweite Störgröße der Rauscheinfluss des Messsystems berücksichtigt. Frequenz und Amplitude des simulierten Rauschens werden dabei dem in Abschnitt 3.7.3 beschriebenen real gemessenen Rauschen angenähert. Die einzelnen Rauschwerte werden für jedes Absorbanzspektrum mithilfe eines Zufallsalgorithmus (*randn*, MATLAB) aus einem vorgegebenen Rauschintervall ausgewählt. Abbildung 4.7a zeigt beispielhaft gemessenes und modelliertes Rauschen. Ein solcher modellierter Rauschvektor wird auf jedes Absorbanzspektrum addiert, wie in einem Beispiel in Abbildung 4.7b gezeigt.

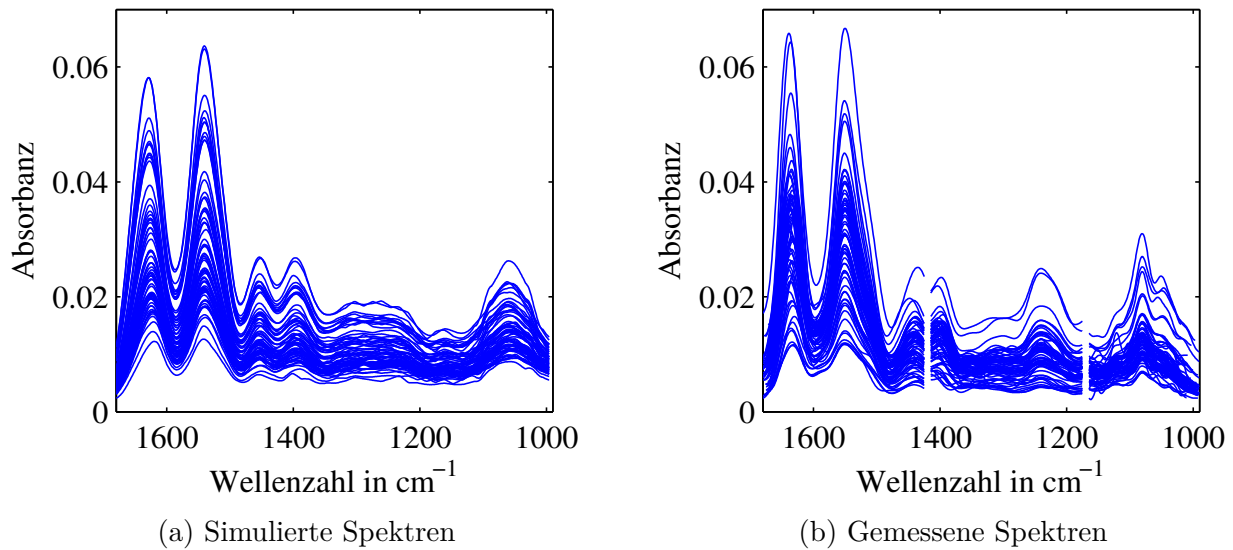


Abbildung 4.8: Vergleich zwischen 64 simulierten (a) und 64 gemessenen (b) Spektren. Die simulierten Wasserschichtdicken sind zwischen $0,09\ \mu\text{m}$ und $0,95\ \mu\text{m}$ dick. Für diesen Fall sind Größenordnung und Streuung der Absorbanzen zwischen simulierten und gemessenen Spektren vergleichbar. Bei [BGM⁺03] wurden bei geschätzten Wasserschichtdicken zwischen $0\ \mu\text{m}$ und $1\ \mu\text{m}$ Gewebesignale gemessen, bei $2\ \mu\text{m}$ nicht mehr. Die simulierten Wasserschichtdicken zwischen $0,09\ \mu\text{m}$ und $0,95\ \mu\text{m}$ erscheinen daher plausibel. Die prinzipiell unterschiedlichen Spektrenformen zwischen (a) und (b) resultieren vor allem daraus, dass das für die Simulation verwendete zugrundeliegende Transmissionsspektrum von einer Messung an Hirngewebe stammt, die bei (b) gezeigten Spektren von Lebergewebe. Material und Methoden für die Aufnahme der in (b) gezeigten Spektren sind in Abschnitt 4.2 beschrieben.

4.1.5 Simulationsergebnisse und Modellvalidierung

Modellvalidierung

Abbildung 4.8 zeigt als Validierung des in den letzten Abschnitten beschriebenen Modells den beispielhaften Vergleich zwischen 64 simulierten und 64 gemessenen Spektren. Bei Verwendung von $d_{min} = 0,09\ \mu\text{m}$ und $d_{max} = 0,95\ \mu\text{m}$ sind die Spektren bezüglich der Größenordnung der Absorbanzen vergleichbar. Bei [BGM⁺03] werden maximale Wasserschichtdicken von etwa $1\ \mu\text{m}$ genannt, um bei Messungen mit diffuser Reflexion (s. Abschnitt 2.4.2) noch Gewebesignale zu erhalten. Die hier in der Simulation verwendeten Wasserschichtdicken liegen in dieser Größenordnung und scheinen daher plausibel.

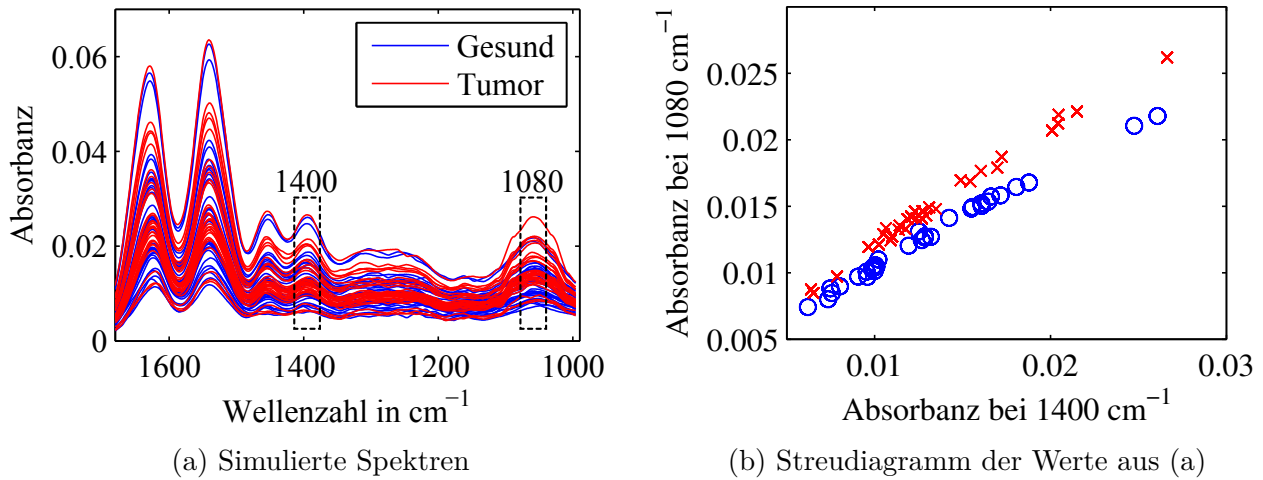


Abbildung 4.9: (a) 64 simulierte Spektren für eine modellierte 20%ig höhere Absorption von Tumorgewebe bei 1080 cm^{-1} ($C_{t/g} = 1,2$). Die 64 Spektren unterscheiden sich voneinander aufgrund von Wasserschichtdickenvariation, aufgrund des Gewebeunterschieds ($C_{t/g}$) sowie aufgrund von Rauschen. Je dicker die Wasserschicht, desto niedriger die Absorbanz. (b) Streudiagramm der in (a) gekennzeichneten Absorbanzwerte.

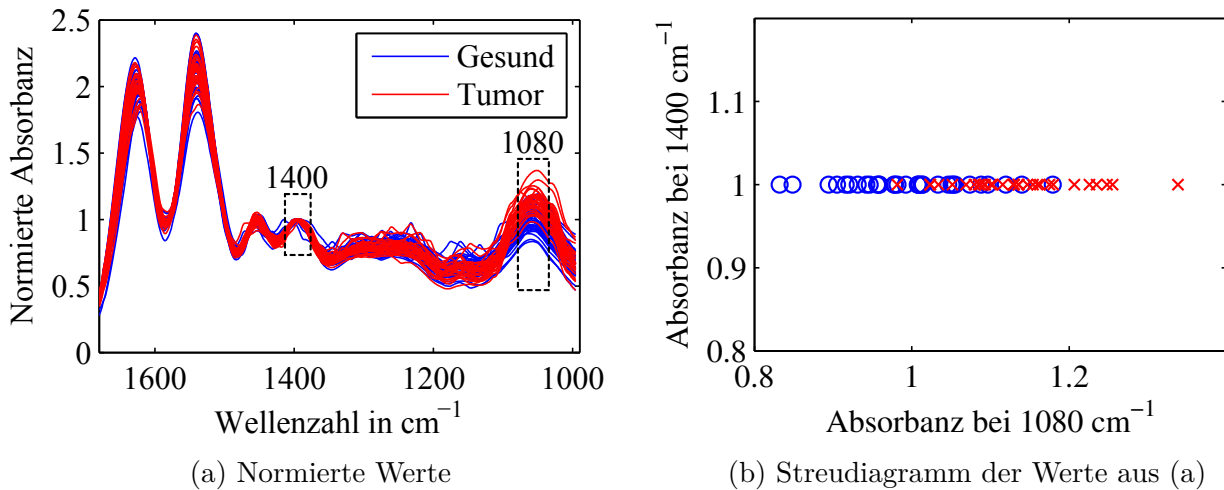


Abbildung 4.10: (a) Normierung der in Abbildung 4.9a gezeigten Spektren auf den maximalen Wert der Bande bei ca. 1400 cm^{-1} . (b) Streudiagramm der entsprechenden Absorbanzwerte aus (a). Durch Bildung von Absorbanzverhältnissen ist in diesem Beispiel keine klare Gewebeunterscheidung möglich, wie die Überschneidung der Werte in (b) zeigt.

Simulationsergebnisse

Gewebeunterscheidung für verschiedene tatsächliche Absorptionsunterschiede

Abbildung 4.9a zeigt beispielhaft 64 simulierte Spektren bei einer um 20% erhöhten tatsächlichen Absorption von Tumorgewebe bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} ($C_{t/g} = 1,2$; s. Abbildung 4.4a). Abbildung 4.9b zeigt die Absorbanzwerte der in 4.9a gezeigten Spektren für die entsprechend markierten Wellenzahlen. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, könnten die in Abbildung 4.9a gezeigten Spektren und auch die in Abbildung 4.9b gezeigten Werte ohne weitere Datenverarbeitung nicht klar voneinander unterschieden werden, wären sie hier nicht zu Darstellungszwecken farblich codiert.

Durch Anwendung univariater Methoden (s. Abschnitt 2.6.2) ist eine Unterscheidung von Spektren bei ausreichend großen spektralen Unterschieden möglich. Beispielsweise könnten die Verhältnisse der Absorbanzen bei 1080 cm^{-1} zu den Absorbanzen bei 1400 cm^{-1} zur Differenzierung verwendet werden. Bei dem hier gezeigten Fall für $C_{t/g} = 1,2$ ist der Erfolg dieses Verfahrens allerdings begrenzt, wie in Abbildung 4.10 gezeigt. Abbildung 4.10a enthält die Spektren aus Abbildung 4.9a, jedoch wurde jedes dieser Spektren durch den jeweiligen maximalen Absorbanzwert im Bereich um 1400 cm^{-1} geteilt. Die Spektren wurden somit auf den maximalen Absorbanzwert um 1400 cm^{-1} normiert, weswegen jedes Spektrum im Bereich 1400 cm^{-1} den Wert 1 aufweist. Abbildung 4.10b zeigt das resultierende Streudiagramm. Zu sehen ist, dass die Verhältnisse der genannten Absorbanzwerte aufgrund des Wasser- und Rauscheinflusses keine klare Unterscheidung der beiden Gewebearten ermöglichen, da sich die Werte der beiden Gewebearten überschneiden.

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 4.11a eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, s. Abschnitt 3.3.2) der in Abbildung 4.9b gezeigten Werte. Im Gegensatz zu der in Abbildung 4.10b demonstrierten univariaten Methode ist mit diesem Verfahren eine klare Unterscheidung der Gewebearten für $C_{t/g} = 1,2$ möglich, wie in Abbildung 4.11a gezeigt.

Eine Simulation von 100×64 Spektren ergab bei Anwendung der in Abbildung 4.11a gezeigten Hauptkomponentenanalyse eine mittlere Richtigkeit, eine mittlere Sensitivität und eine mittlere Spezifität von jeweils näherungsweise 99%¹⁰. Die Begriffe sind in den Gleichungen (4.14) bis (4.16) definiert [Met78], Tabelle 4.1 zeigt die genannten Werte. Als „richtig positive Entscheidungen“ werden richtig klassifizierte rote Kreuze (Tumorgewebe) verstanden, als „richtig negative Entscheidungen“ richtig klassifizierte blaue Kreise (gesundes Gewebe).

¹⁰Bei Anwendung von Datennormierungsmethoden (s. Abschnitt 2.6.2) wurden schlechtere Ergebnisse als die in Tabelle 4.1 gezeigten erreicht. Datennormierung fand daher nicht statt.

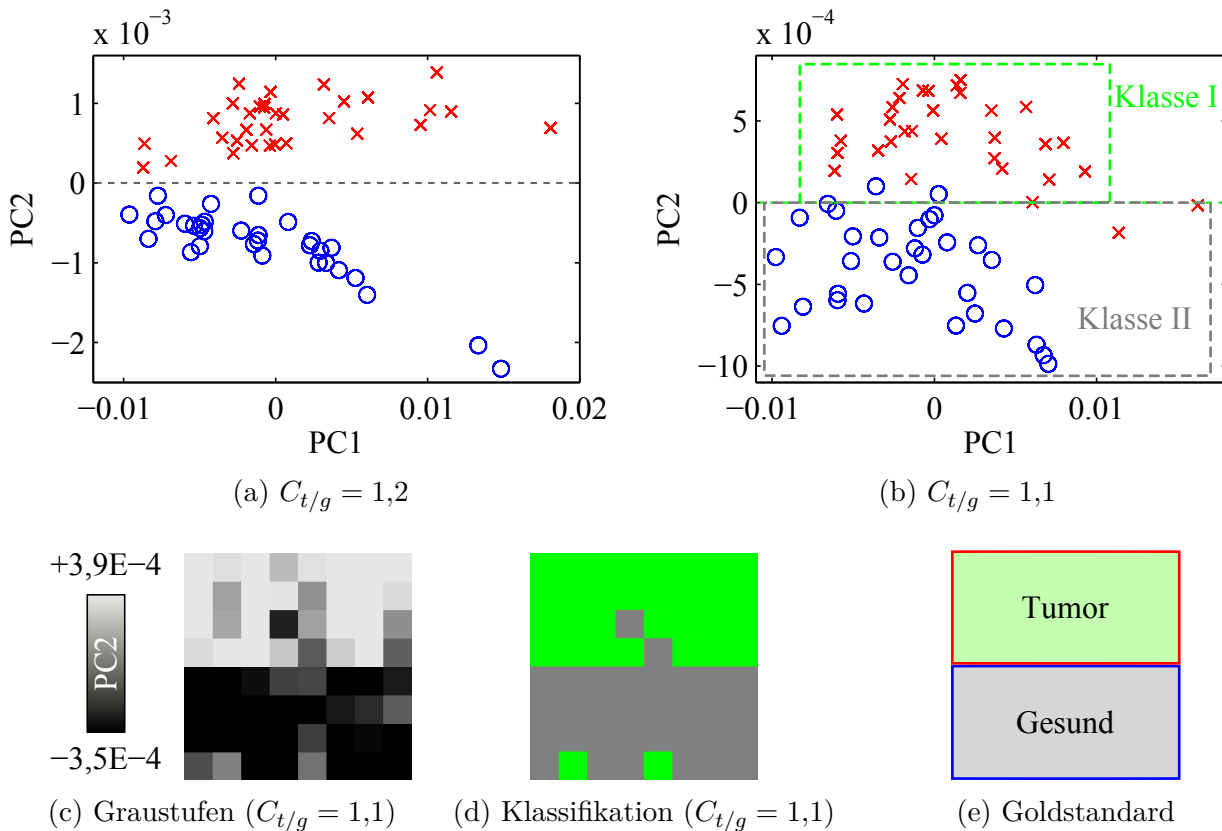


Abbildung 4.11: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse für zwei verschieden starke modellier- te Unterschiede zwischen tumorösem und gesundem Gewebe, d.h. für unter- schiedliche Werte für $C_{t/g}$. Bei (a) wird eine vollständige Klassenunterscheidung der in Abbildung 4.9a gezeigten Spektren erreicht, bei (b) werden zwei rote Kreuze und zwei blaue Kreise falsch klassifiziert; Sensitivität und Spezi- fität betragen daher jeweils $30/32 \approx 0,94$ (s. Gleichungen (4.15) und (4.16)). Sowohl bei (a) als auch bei (b) beschreibt PC2 die relevante Information (Ge- webeunterschiede); PC1 hingegen beschreibt die aus unterschiedlichen Wasser- schichtdicken resultierende hohe Varianz (s. Abbildung 4.12) und ist daher für die Auswertung nicht relevant. (c) zeigt die Zuordnung der in (b) gezeigten PC2-Werte zu beispielhaften Orten in Form eines Graustufenbildes; in Anle- hung an spätere Gewebeexperimente werden die mittleren 50 % der PC2-Werte verwendet, um Übergangsbereiche zu zeigen; die übrigen 50 % der Werte sind entsprechend ihres Wertes jeweils schwarz oder weiß. (d) zeigt die schwellwert- basierte ($PC2 = 0$) Klassifikation aus (b), bezogen auf die beispielhaften Orte. (e) zeigt den „Goldstandard“, d.h. die beispielhafte tatsächliche räumliche Ge- webeverteilung. Im Vergleich zwischen (d) und (e) sind die zuvor erwähnten vier falsch klassifizierten Pixel zu erkennen.

Tabelle 4.1: Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität (s. Gleichungen (4.14) bis (4.16)) für verschieden starke Unterschiede zwischen tumorösem und gesundem Gewebe, wobei $C_{t/g}$ die gegenüber gesundem Gewebe erhöhte Absorbanz des tumorösen Gewebes bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} beschreibt. Neben den fett gedruckten Mittelwerten sind die Standardabweichungen sowie die Mediane angegeben. Die Werte ergeben sich aus jeweils $N = 100$ Simulationen von je 64 Spektren (32 rote Tumorspektren, 32 blaue Normalgewebespektren). Die ersten drei Spalten berücksichtigen beide Störgrößen, in Spalte „**1,05 R**“ wird lediglich Rauschen betrachtet, in den Spalten „**1,05 WV1**“ und „**1,05 WV2**“ lediglich Wasserschichtdickenvariation. Die letzten beiden Spalten unterscheiden sich in Bezug auf den verwendeten Schwellwert (s. Abbildung 4.14). Die gezeigten Werte wurden gerundet.

$C_{t/g}$	1,2	1,1	1,05	1,05 R	1,05 WV1	1,05 WV2
Richtigkeit	0,99	0,94	0,80	0,86	0,95	0,98
Standardabw.	0,01	0,03	0,05	0,04	0,02	0,02
Median	1,00	0,94	0,80	0,86	0,95	0,98
Sensitivität	0,99	0,94	0,80	0,86	1,00	1,00
Standardabw.	0,01	0,04	0,06	0,05	0,00	0,00
Median	1,00	0,94	0,78	0,88	1,00	1,00
Spezifität	0,99	0,93	0,80	0,86	0,91	0,96
Standardabw.	0,02	0,04	0,06	0,06	0,04	0,03
Median	1,00	0,94	0,81	0,88	0,91	0,97

$$\text{Richtigkeit} = \frac{N_{\text{richtig positive Entscheidungen}}}{N_{\text{alle Fälle}}} + \frac{N_{\text{richtig negative Entscheidungen}}}{N_{\text{alle Fälle}}} \quad (4.14)$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{N_{\text{richtig positive Entscheidungen}}}{N_{\text{tatsächlich positive Fälle}}} \quad (4.15)$$

$$\text{Spezifität} = \frac{N_{\text{richtig negative Entscheidungen}}}{N_{\text{tatsächlich negative Fälle}}} \quad (4.16)$$

Abbildung 4.11b zeigt analog zu Abbildung 4.11a das Streudiagramm für einen Unterschied zwischen tumorösem und normalem Gewebe von 10%, d.h. $C_{t/g} = 1,1$. Durch den geringeren Gewebeunterschied sind Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität nach Tabelle 4.1 entsprechend reduziert.

In Abschnitt 3.3.2 wurde beschrieben, dass die erste Hauptkomponente PC1 grundsätzlich die Richtung der maximalen Varianz im Datensatz beschreibt. Die maximale Varianz, d.h. die dominanten Unterschiede zwischen den in Abbildung 4.9a gezeigten simulierten Spektren, ergibt sich aus den unterschiedlichen Wasserschichtdicken, die zu der gezeigten Absorbanzvarianz der Spektren führen. PC1 wird daher vor allem durch die Wasserschichtdickenvariation bestimmt. Dies zeigt Abbildung 4.12: Wird bei gleichbleibendem Unterschied zwischen Tumor-

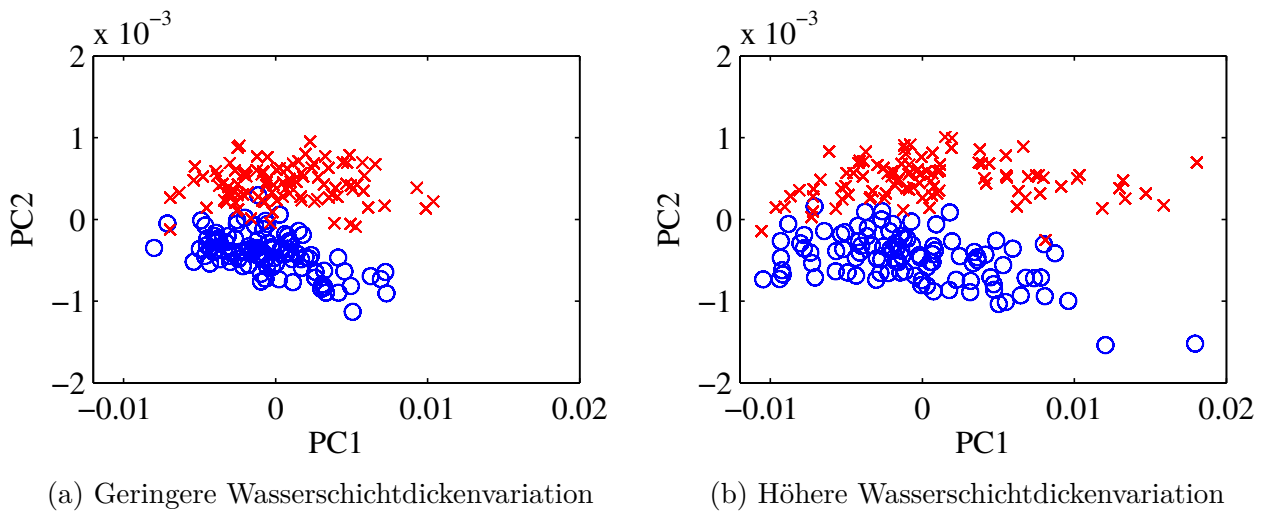


Abbildung 4.12: Einfluss der Änderung der Wasserschichtdickenvariation auf die Varianz der Hauptkomponenten. PC1 beschreibt grundsätzlich die Richtung der maximalen Varianz im Datensatz (s. Abschnitt 3.3.2). Bei einer Erhöhung der Wasserschichtdickenvariation erhöht sich auch die Varianz der PC1-Werte, wie der Vergleich zwischen (a) und (b) zeigt. Da zudem keine Korrelation zwischen den Gewebeunterschieden und PC1 zu erkennen ist, beschreibt PC1 mit hoher Wahrscheinlichkeit die Wasserschichtdickenvariation. (a) und (b) wurden mit identischem Gewebeunterschied ($C_{t/g} = 1,1$) simuliert. Die Wasserschichtdicken betragen in (a) zwischen $0,2\ \mu\text{m}$ und $0,8\ \mu\text{m}$, in (b) zwischen $0,005\ \mu\text{m}$ und $0,9\ \mu\text{m}$. Es wurden in (a) und (b) jeweils 200 Werte simuliert.

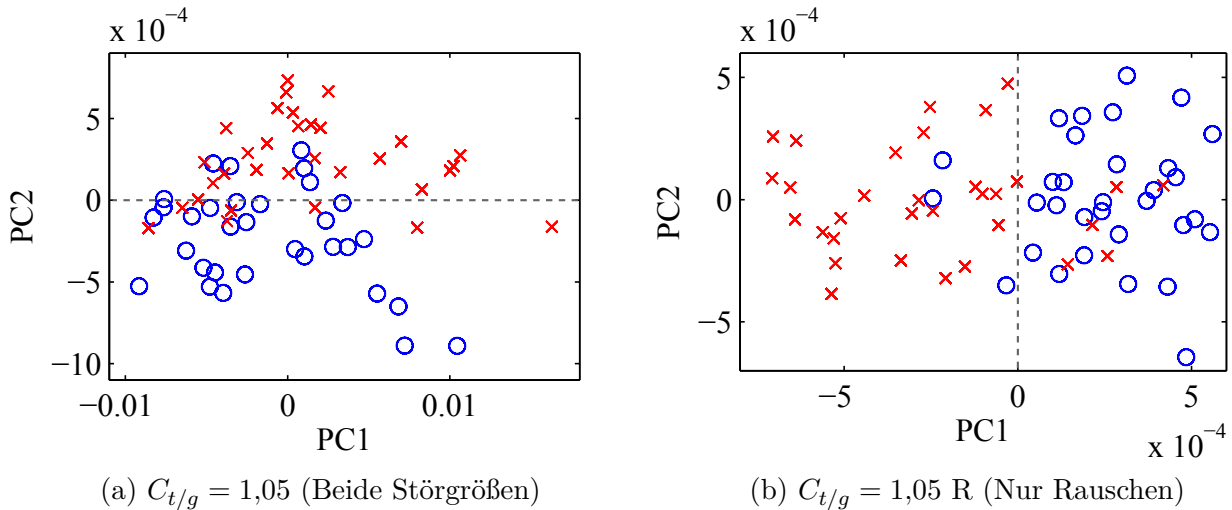


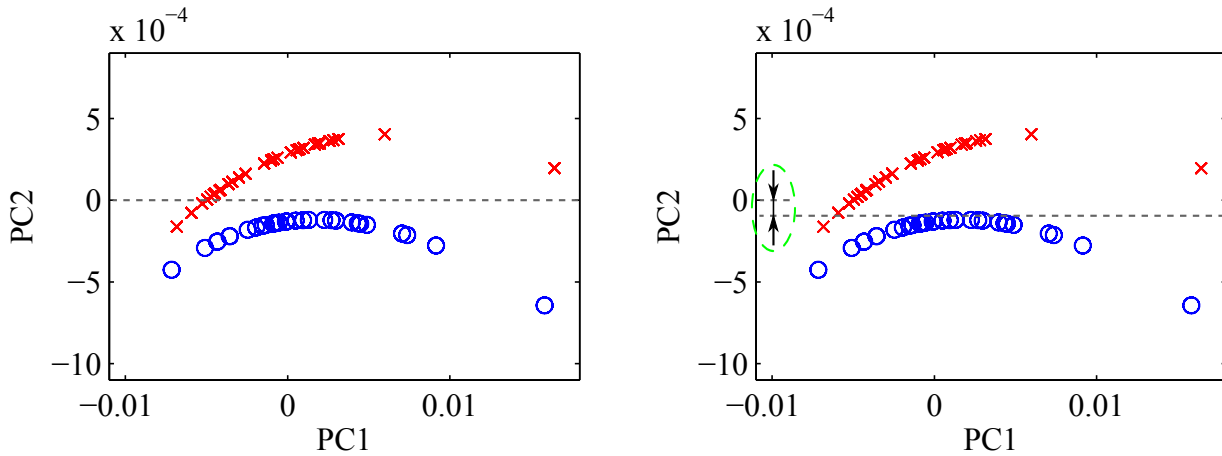
Abbildung 4.13: (a) Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse für einen Absorptionsunterschied zwischen den Gewebearten von 5% unter Berücksichtigung beider Störgrößen. (b) Ergebnis bei ausschließlicher Betrachtung von Rauschen unter Vernachlässigung von Wasserschichtdickenvariation. Die fest eingestellte Wasserschichtdicke beträgt $0,52 \mu\text{m}$ (Mittelwert der sonst verwendeten Wasserschichtdicken Grenzen). Die Gewebedifferenzierung erfolgt in (b) anhand der Dimension PC1, da bei Wegfall der Wasserschichtdickenvariation die maximale Varianz im Datensatz durch die Gewebeunterschiede bestimmt wird (vgl. Abbildung 4.12).

und Normalgewebe (hier $C_{t/g} = 1,1$) die Stärke der Wasserschichtdickenvariation verändert, so verändert sich vor allem auch die Varianz von PC1 im Streudiagramm der Hauptkomponentenanalyse. Da die Wasserschichtdickenvariation für die Gewebedifferenzierung nicht von Interesse ist, findet PC1 in der Auswertung keine Anwendung. Anhand von PC2 hingegen ist eine Unterscheidung der Klassen möglich, wie Abbildung 4.11 zeigt.

Vergleich von Wasserschichtdickenvariation und Rauschen

Um die limitierende der beiden Störgrößen „Wasserschichtdickenvariation“ und „Rauschen“ zu ermitteln, wurde eine Simulation mit $C_{t/g} = 1,05$ durchgeführt, bei der einmal ausschließlich der Rauscheinfluss (keine Wasserschichtdickenvariation, Abbildung 4.13b) und einmal ausschließlich der Einfluss der Wasserschichtdickenvariation (kein Rauschen, Abbildung 4.14) betrachtet wurde. Das Ergebnis unter Berücksichtigung *beider* Störgrößen zeigt Abbildung 4.13a, alle Ergebniswerte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Das in Tabelle 4.1 gezeigte Ergebnis für die ausschließliche Betrachtung des Rauscheinflusses (Spalte „ $C_{t/g} = 1,05$ R“, s. auch Abbildung 4.13b) ist schlechter als das Ergebnis für die ausschließliche Betrachtung der Wasserschichtdickenvariation (Spalte „ $C_{t/g} = 1,05$ WV1“, s. auch Abbildung 4.14a). Daraus lässt sich ableiten, dass das Absorbanzrauschen die Gewebedifferenzierung wahrscheinlich stärker limitiert als die Wasserschichtdickenvariation.



(a) $C_{t/g} = 1,05$ WV1 (Nur Dickenvariation);
Schwellwert bei $PC2 = 0$

(b) $C_{t/g} = 1,05$ WV2 (Nur Dickenvariation);
Veränderter Schwellwert

Abbildung 4.14: (a) Ergebnis bei ausschließlicher Betrachtung von Wasserschichtdickenvariation unter Vernachlässigung von Rauschen für zwei unterschiedliche Schwellwerte. Der bei (a) gezeigte Schwellwert liegt bei $PC2 = 0$, der bei (b) angedeutete Schwellwert liegt bei 99 % des Abstandes zwischen $PC2 = 0$ und dem maximalen $PC2$ -Wert aller blauen Kreise.

Bei dem in Abbildung 4.14a beispielhaft gezeigten Ergebnis der Vernachlässigung des Rauscheinflusses ist zu erkennen, dass sogar eine klare räumliche Trennung der beiden Gewebearten vorliegt. Diese Trennung wird allerdings durch die Hauptkomponentenanalyse aufgrund der gekrümmten Formen der Gruppierungen nur begrenzt erkannt.

In den bisherigen Fällen wurden zur Unterscheidung der Gewebearten die Schwellwerte $PC2 = 0$ bzw. $PC1 = 0$ verwendet, wie in den entsprechenden Streudiagrammen gezeigt. Wird jedoch der Schwellwert verschoben, wie in Abbildung 4.14b angedeutet, so werden bei exklusiver Betrachtung der Wasserschichtdickenvariation Sensitivität und Spezifität verbessert. Das Ergebnis ist in Spalte „ $C_{t/g} = 1,05$ WV2“ in Tabelle 4.1 dargestellt. Die dort gezeigten Ergebnisse wurden erreicht, indem in der Simulation der jeweilige Schwellwert bei 99 % des Abstandes¹¹ zwischen $PC2 = 0$ und dem maximalen $PC2$ -Wert aller blauen Kreise gesetzt wurde. Aufgrund der mit dem Auge zu erkennenden klaren räumlichen Trennung zwischen den Gewebearten scheint es für diesen Fall wahrscheinlich, dass durch aufwändigere Datenverarbeitung sogar eine noch höhere Richtigkeit erreichbar wäre.

¹¹Der maximale $PC2$ -Wert liegt bei 100 % des Abstandes, daher wurde 99 % des Abstandes verwendet, um für den Schwellwert einen minimal höheren Wert als den maximalen $PC2$ -Wert zu erhalten.

4.1.6 Aussagen der Simulation

Bei [LHL⁺02, SGS⁺09, BMR⁺12] sind je nach Art der Untersuchung Richtigkeiten, Sensitivitäten und Spezifitäten zwischen ca. 90 % und 100 % für FTIR-Messungen an getrocknetem Tumorgewebe beschrieben. Für Werte dieser Größenordnung ergibt die Simulation einen notwendigen Gewebeabsorptionsunterschied nach Tabelle 4.1 im Bereich von ungefähr $C_{t/g} = 10\%$. Die in diversen Publikationen gezeigten unterschiedlichen Spektren für tumoröses und gesundes Gewebe zeigen relative spektrale Unterschiede, die sich in der Größenordnung um 10 % oder auch mehr bewegen (z.B. [YOG⁺00, CHW⁺03, KIBH⁺09, GHP⁺13]). Teilweise sind dies sogar relative spektrale Unterschiede zwischen den auch in der Simulation verwendeten Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} [KIBH⁺09, YOG⁺00]. Es handelt sich bei den dort gezeigten Spektren jedoch um einzelne oder gemittelte Spektren, so dass eine Aussage darüber schwierig ist, ob 10 % Unterschied für eine klare Differenzierung ausreichen oder nicht; die Streuung der spektralen Eigenschaften innerhalb einer Gewebeart ist für eine solche Aussage entscheidend.

Die Simulation ermöglicht neben der getätigten Aussage über den notwendigen Gewebeunterschied vor allem auch eine Einschätzung darüber, ob das Spektrometer in Bezug auf die Anwendung verbessert werden kann: In Bezug auf das grundlegende Konzept der Wasserverdrängung mittels ATR-Kristall bildet der Einfluss der Wasserschichtdickenvariation die natürliche Grenze der erreichbaren Sensitivität bzw. Spezifität¹².

Dem Simulationsergebnis nach ist diese durch Wasserschichtdickenvariation gesetzte Grenze allerdings nicht erreicht, da es sich bei dem aktuell limitierenden Einfluss vermutlich um das in Abschnitt 3.7.3 beschriebene Absorbanzrauschen handelt. Das dadurch bestehende Potenzial ermöglicht daher durch Verbesserung des Rauschniveaus höhere Sensitivitäten bzw. Spezifitäten. In Abschnitt 3.7.3 wurde vermutet, dass das Absorbanzrauschen durch Laserintensitätsschwankungen, Variationen von Drehgittergeschwindigkeiten und Strahllageinstabilitäten dominiert wird. Diesbezüglich leistungsfähigere QCL-Systeme könnten in Zukunft daher zu besseren Ergebnissen beitragen.

Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit zur Erhöhung von Sensitivität und Spezifität ist die Verwendung einer Methode, die stärkere Absorption ermöglicht. Dies könnte z.B. erreicht werden durch die Verwendung eines Mehrfachreflexions-ATR-Kristalls (s. Abschnitt 2.4.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine ATR-Kristallgeometrie entwickelt und beim Deutschen Patent- und Markenamt angemeldet, die Mehrfachreflexion und gleichzeitig Bildgebung ermöglicht [GKS14]. Durch die Realisierung dieses Konzepts würden die in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Vorteile eines Mehrfachreflexionskristalls mit den Vorteilen von Bildgebung ver-

¹²Dies gilt, wenn Mechanismen wie z.B. oberflächliche aktive Gewebetrocknung vor dem Anpressen des Kristalls nicht betrachtet werden.

eint werden. Die daraus resultierende höhere Absorbanz würde bei Gelingen zu einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis im Absorbanzraum und somit zu höheren Sensitivitäten und Spezifitäten führen.

4.1.7 Diskussion des Simulationsmodells

Das in den letzten Abschnitten beschriebene Simulationsmodell bildet die Prozesse des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Spektrometers ab. Dadurch wird ein besseres Systemverständnis ermöglicht, es können einzelne Einflüsse, z.B. unterschiedliche Rauscharten, getrennt voneinander untersucht werden und es können Aussagen bezüglich der Sensitivität und Spezifität für gegebene Gewebeunterschiede getroffen werden.

Das Modell geht davon aus, dass sich die Spektren *innerhalb* der beiden Gewebearten ausschließlich aufgrund von Rauschen und Wasserschichtdickenvariation unterscheiden, d.h. chemisch begründete Unterschiede innerhalb einer Klasse werden nicht abgebildet. Diese treten in der Realität aber mit hoher Wahrscheinlichkeit auf, beispielsweise aufgrund örtlich verteilter, unterschiedlicher Wachstumsphasen von Tumorgewebe. Der für eine Differenzierung genannte notwendige Absorptionsunterschied zwischen gesundem und tumorösem Gewebe von 10% bei einer bestimmten Wellenzahl wird daher nicht für die mittleren Spektren zweier Klassen gelten, sondern es sind, wie in Abschnitt 4.1.6 bereits genannt, Varianzen innerhalb einer Klasse zu berücksichtigen.

Da eine Methode zur Messung der Wasserschichtdicke zwischen Gewebe und Kristall nicht verfügbar scheint [BGM⁺03] oder zumindest in unangemessenem Verhältnis zum Aufwand stünde, wurden die Grenzen der Wasserschichtdicken iterativ aus dem Vergleich mit realen Messungen ermittelt und durch Literaturwerte gestützt. Eine vollständig sichere Validierung des Gewebemodells ist daher aufgrund der Unklarheit über die tatsächlichen Wasserschichtdicken nicht gegeben.

4.2 Hyperspektrale Bildgebung von Tumorgewebe

Dieser Abschnitt illustriert die Ergebnisse der Gewebedifferenzierung mittels des in Kapitel 3 beschriebenen Laboraufbaus. Es wurde frisches, ungetrocknetes (natives) Gewebe verwendet, um die spätere Situation der Messung an lebendem Gewebe im Operationssaal nachzustellen.

4.2.1 Material und Methoden

Material

Das langfristige Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Differenzierung von lebendem Gewebe bei Operationen am Menschen (s. Abschnitt 1.5). Frische humane Proben sind allerdings aus Ethikgründen nur sehr eingeschränkt verfügbar, weswegen die im Folgenden gezeigten Experimente mit Geweben von Hunden und einer Katze durchgeführt wurden. Bei [WKM14] wird in der Infrarotspektroskopie ebenfalls Krebs bei Hunden als Vergleichsmodell für Krebs beim Menschen verwendet. Bei [PCK07] werden zudem in Bezug auf Krebs starke Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Hund beschrieben, beispielsweise in Bezug auf histologisches Aussehen, Tumorgenetik oder biologisches Verhalten. Es scheint daher wahrscheinlich, dass die Ergebnisse spektraler Untersuchungen von Hundetumorgewebe sich in einem hohen Grad auf menschliches Gewebe übertragen lassen.

Bei allen verwendeten Tieren handelte es sich um Haustiere privater Halter. Die Tiere wurden aufgrund ihrer Krankheit eingeschläfert und nicht aufgrund der Verwendung für die vorliegende Arbeit. Die Art des Gewebes sowie der Zeitpunkt der Probenverfügbarkeit waren daher zufällig. Für jeden der Fälle gaben die Tierhalter eine schriftliche Einwilligung für die entsprechende Verwendung.

Sämtliche Gewebe und histopathologischen Untersuchungen stammen von Prof. Dr. Kaspar Matiasek vom Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Jede Gewebeprobe wurde kurze Zeit¹³ nach Ableben des Tieres in der genannten Tierpathologie entnommen und direkt danach auf Größen von etwa $2 \times 1,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$ zugeschnitten; die Proben wogen jeweils etwa zwischen einem und drei Gramm. Jedes der Gewebestücke entsprach einem Verbund aus sowohl Tumor- als auch Normalgewebe. Unmittelbar nach dem Zuschneiden wurde das Gewebe in einem luftdichten Plastikgefäß verpackt und innerhalb von etwa einer Stunde zum Messort gebracht. Durch die luftdichte Verpackung wurde der Trocknungsvorgang und die damit verbundene Gewebeveränderung minimiert.

Folgende Gewebearten wurden im Verbund mit umgebendem gesundem Gewebe gemessen (s. Tabelle 4.2):

- Zwei Gallengangskarzinome¹⁴ derselben Hundeleber,

¹³Minuten bis wenige Stunden, je nach Gewebe.

¹⁴Ein Karzinom ist ein „vom Epithel ausgehender maligner Tumor“ [Psc12]. Epithelgewebe ist „ein geschlossener Zellverband, der innere oder äußere Körperoberflächen bedeckt.“ [Psc12].

Tabelle 4.2: Herkunft der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Karzinome (K.).

Tumorart	Gallengangsk. (2x)	Adenok.	K.metastase	Neuroendokrines K.
Organ	Leber	Niere	Lunge	Hirn
Tierart	Hund	Katze	Hund	Hund
Rasse	Golden Retriever	Europ. Kurzhaar	Mischling	n.a.
Geschlecht	weiblich	weiblich	männlich	männlich
Alter	10 Jahre	16 Jahre	adult	adult

- ein Adenokarzinom¹⁵ einer Katzenniere,
- eine Karzinometastase¹⁶ einer Hundelunge,
- ein neuroendokrines¹⁷ Karzinom eines Hundehirns.

Nach [BDHM08a, S. 202] handelt es sich bei 80 % aller maligner Tumoren um Karzinome. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Proben sind daher repräsentativ für einen Großteil auftretender Krebsarten.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die genauen Orte von Tumor- und Normalgewebe im Gewebeverbund vor der Messung nicht bekannt waren, da vor den Messungen keine histopathologischen Untersuchungen (s. Abschnitt 1.3.1) durchgeführt wurden.

Die gemessenen Gewebeausschnitte wurden über die Lage auf dem Kristall rekonstruiert und in Gewebefotografien für den Pathologen markiert. Nach den spektralen Messungen wurde das jeweilige Gewebe in Formalin eingelegt und an die Tierpathologie zurückgeschickt. Dort wurden Gewebeschnitte als Goldstandard zur Überprüfung der Messergebnisse angefertigt; je nach Fall wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin, Picrosirius-Rot oder Masson-Trichrom gefärbt (s. Ergebnisteil). Die Zuordnung der Messergebnisse zu den histologischen Ergebnissen sowie die Aufnahme der im Ergebnisteil gezeigten Fotografien der gefärbten Gewebeschnitte erfolgten durch den Pathologen.

Bei der Verwendung von frischem, nicht fixiertem und somit flexiblem Gewebe kann es z.B. aufgrund von Handhabungsvorgängen zwischen der hyperspektralen Messung bzw. fotografischen Aufnahme des frischen Gewebes und dem Anfertigen des histopathologischen Schnitts zu Formveränderungen des Gewebes kommen. Der exakte Vergleich zwischen Fotografie, hyperspektraler Messung und histologischem Schnitt ist daher immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die ungefähren Grenzen zwischen tumorösen und gesunden Bereichen bleiben jedoch erhalten.

¹⁵ „Von Drüsen- oder Schleimhautepithelien ausgehender maligner (...) Tumor“ [Psc12]

¹⁶ Metastasen entstehen „durch Absiedelung und Verschleppung von Tumorzellen (sog. Tochtergeschwulste)“ [Psc12].

¹⁷ „Die Sekretion von Neurohormonen betreffend“ [Psc12].

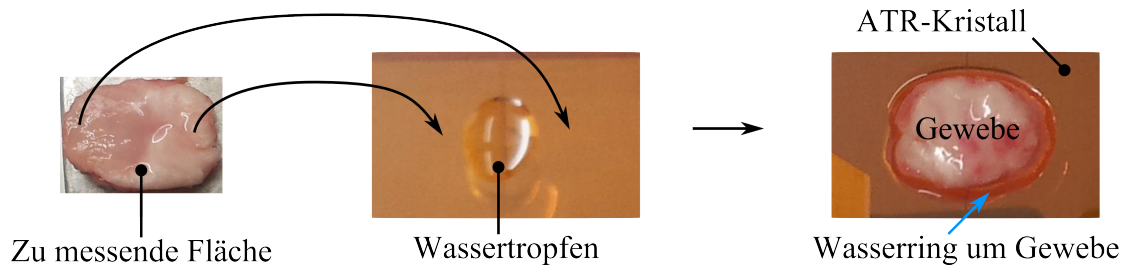


Abbildung 4.15: Probenplatzierung vor einer Messung: Das Gewebe wird mit der zu messenden, befeuchteten Fläche nach unten auf den ATR-Kristall gelegt. Durch den dort platzierten Wassertropfen wird die zu messende Seite zusätzlich befeuchtet. Dadurch soll die Messung von feuchtem in vivo-Gewebe nachgestellt werden. Die freiliegende Seite des Gewebes wird nach der Platzierung ebenfalls zusätzlich mit Wasser befeuchtet, um ein Trocknen zu verhindern. Das Wasser zwischen Kristall und Gewebe wird aufgrund des Gewebeeigengewichts und ggf. extern aufgebrauchten Anpressdrucks teilweise nach außen verdrängt. Es bildet sich daher ein Wasserring um das Gewebe, der auch am Ende der Messung noch vorhanden ist.

Methoden

Es wurde das in Kapitel 3 beschriebene Spektrometer verwendet. Für eine Messung wurde die entsprechende feuchte Probe aus dem luftdichten Transportbehälter genommen und die zu messende Seite des Gewebes mit mehreren Millilitern Wasser zusätzlich befeuchtet. Auf den Kristall wurde ein Wassertropfen mit einem Volumen von wenigen zehntel Millilitern gegeben, wie in Abbildung 4.15 dargestellt. Im Anschluss daran wurde die Probe mit der zu messenden Seite nach unten auf den ATR-Kristall gelegt und für ca. 1 s manuell leicht angepresst. Der Tropfen wurde dadurch zu einem Wasserfilm zwischen Gewebe und Kristall gestreckt bzw. nach außen verdrängt (s. Abbildung 4.15). Die Oberseite der Probe wurde mit wenigen Millilitern Wasser ebenfalls befeuchtet, um das Austrocknen der Probe während der Messung zu reduzieren.

Bei jeder Messung wurde das auf dem Kristall befindliche Gewebe an 8×8 Orten mit einem Abstand von 1 mm in jede Richtung gemessen. Dabei wurde an jedem Ort ein Spektrum von ca. 1680 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} aufgenommen¹⁸.

Bei den Hintergrundmessungen befand sich eine mehrere Millimeter dicke Wasserschicht auf dem Kristall, um den Einfluss der Wasserinformation auf das resultierende Absorbanzspektrum zu verringern und so die Gewebeinformation hervorzuheben (s. Abbildung 4.6). Pro Gewebeart wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt.

¹⁸Aufgrund der Variation der Start- und Zielwellenzahlen des verwendeten QCL-Systems unterscheiden sich die Bandbreiten der aufgenommenen Spektren, wie im Ergebnisteil zu sehen.

Bei den Messungen des zweiten Gallengangs-, des Nieren- sowie des Lungengewebes wurde aufgrund der vergleichsweise unebenen, d.h. nicht planen Gewebeoberflächen mit dem in Abbildung 3.9 gezeigten Anpressmechanismus ein auf das Gewebe wirkendes Gewicht von ungefähr 50×10^{-3} kg aufgebracht, um ein gleichmäßiges Anliegen des Gewebes am Kristall zu gewährleisten. Bei den Messungen des ersten Gallengangs- sowie des endokrinen Gewebes wurde aufgrund der ausreichend planen Gewebeoberflächen kein externer Anpressdruck aufgebracht, d.h. die Wasserverdrängung erfolgte lediglich durch das erwähnte kurzzeitige manuelle Anpressen beim Platzieren des Gewebes sowie durch das Gewebeeigengewicht.

Das erste Gallengangskarzinom wurde in vier Lagen mit unterschiedlicher Orientierung gemessen, um eine Orientierungsabhängigkeit des Messverfahrens auszuschließen. Die übrigen Gewebeproben wurden in jeweils zwei verschiedenen Lagen gemessen, um Wiederholbarkeit zu zeigen; zwischen den Lageänderungen wurde der ATR-Kristall gereinigt und das Gewebe neu befeuchtet. Eine Ausnahme bildet die Messung des zweiten Gallengangsgewebes, das zweimal nacheinander ohne Lageänderung oder erneute Befeuchtung gemessen wurde. Ziel hierbei war es, die zeitliche Konstanz der Messbedingungen zu zeigen.

Für die Datenauswertung wurde die in Abschnitt 3.3.2 skizzierte Hauptkomponentenanalyse verwendet. Eingangsparameter für die Analyse waren die maximalen Absorbanzen der Absorptionsspeaks bei im Folgenden genannten Wellenzahlen; verwendet wurden nicht die Absorbanzen bei exakt diesen Wellenzahlen, sondern die Absorbanzmaxima im Bereich dieser Wellenzahlen. Im vorliegenden Abschnitt beschreiben die genannten Wellenzahlen daher immer nur die ungefähre Position des dort zu findenden Absorptionsspeaks.

Je nach Gewebeart wurden die Absorbanzmaxima bei einer Auswahl der Wellenzahlen 1550 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} und 1045 cm^{-1} als Eingangsparameter für die Analyse verwendet; biochemische Hintergründe werden in Abschnitt 4.2.8 diskutiert. Je nach Gewebeart sind somit unterschiedliche Wellenzahlen für die Auswertung relevant. Die Entscheidung darüber, welche Wellenzahl für eine bestimmte Tumorart in der Auswertung verwendet wird, geschah durch den Vergleich der Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Wellenzahlkombinationen erreicht wurden. Bei bestimmten Geweben wurden die besten Ergebnisse bei Verwendung von lediglich zwei Wellenzahlen erzielt, wie z.B. 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} im Falle des Gallengangsgewebes; im Falle des Nierengewebes hingegen wurden die besten Ergebnisse bei Verwendung aller fünf der oben genannten Wellenzahlen erzielt.

Legitim scheint die Verwendung unterschiedlicher Wellenzahlkonfigurationen vor dem Hintergrund, dass sich die Gewebe auch biochemisch voneinander unterscheiden (s. Abschnitt 1.4.4). Auch bei den histopathologischen Gewebeschnitten, die im Folgenden als Goldstandard verwendet werden, wurden je nach Gewebe- bzw. Tumorart unterschiedliche Färbemittel (Hämatoxylin-Eosin, Masson-Trichrom, Picrosirius-Rot) verwendet. Ebenso kamen bei den

im Stand der Forschung (Abschnitt 1.4) beschriebenen Publikationen je nach Gewebeart unterschiedliche Wellenzahlen für die Auswertung zum Einsatz.

Wie im Simulationsabschnitt 4.1 wurden bei den hier gezeigten Messungen Datennormierungen (s. Abschnitt 2.6.2) nicht angewandt. Grund dafür sind die in diesem Falle schlechteren Ergebnisse¹⁹.

Für die Berechnung der im Ergebnisteil gezeigten hyperspektralen Graustufenbilder aus den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalysen werden jeweils die mittleren 50 % der Werte der zweiten Hauptkomponente (PC2) verwendet. Diese mittleren 50 % der PC2-Werte werden entsprechend ihres Wertes durch Grauwerte zwischen weiß und schwarz dargestellt. Die restlichen 50 % sind entsprechend ihres jeweiligen Wertes schwarz oder weiß. Dunkle Pixel stehen dabei für gesundes, helle Pixel für tumoröses Gewebe (vgl. Abbildung 4.11c). Durch diese Darstellungsform ist es möglich, tumoröse und gesunde Bereiche voneinander abgegrenzt darzustellen und gleichzeitig Übergänge zu zeigen.

Falschfarbenbilder ergeben sich durch manuelles Setzen von Schwellwerten für PC2, um eine mögliche Klassifikation zu zeigen (s. Abschnitt 4.2.1); dabei stehen blaue Pixel für gesundes und rote Pixel für Tumorgewebe. In Zukunft kann die Einordnung der Spektren in verschiedene Klassen auf Grundlage entsprechend aufwändigerer Datenverarbeitung (z.B. mittels „künstlicher neuronaler Netze“ [LHL⁺02, BMR⁺12]) automatisch erfolgen, wenn eine größere Sammlung von Messdaten für einen bestimmten Gewebetyp vorliegt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung der prinzipiellen Machbarkeit.

4.2.2 Ergebnisse der Messung eines ersten Gallengangskarzinoms der Leber

Abbildung 4.16a zeigt eine Fotografie des ersten Gallengangsgewebes in frischem Zustand. Das Gewebe wurde in diesem gezeigten ungetrockneten, nativen Zustand gemessen. Die Tumorgrenzen sind nicht eindeutig zu erkennen, daher ist der gleiche Ausschnitt in Abbildung 4.16b in Form eines histopathologisch gefärbten Schnittes gezeigt, der zeitlich *nach* der spektralen Messung angefertigt wurde. Im Gegensatz zur Fotografie des frischen Gewebes ist im gefärbten Schnitt der gesunde vom tumorösen Bereich eindeutig zu unterscheiden; die Grenze wurde durch den Pathologen bestimmt (s. Abschnitt 4.2.1).

¹⁹Auch in der Literatur wird Datenvorverarbeitung teilweise nicht verwendet. Beispielsweise wird bei [MKP05] Datenvorverarbeitung bei der FTIR-Spektroskopie von Tumorzellen als potenzielle Fehlerquelle gesehen und daher nicht berücksichtigt.

Um die Orientierungsabhängigkeit des Messverfahrens auszuschließen, wurde das Gewebe in den vier verschiedenen in Abbildung 4.16c gezeigten Lagen mit jeweils unterschiedlicher Orientierung gemessen. Zwischen den einzelnen Messungen wurde das Gewebe entfernt, der Kristall gereinigt und das Gewebe neu befeuchtet.

Abbildung 4.16d zeigt die in der ersten Lage aufgenommenen 64 Spektren²⁰. Die hier verwendete Zuordnung zu den beiden Klassen „Tumor“ und „Gesund“ erfolgt auf Grundlage des später in Abbildung 4.17b gezeigten Falschfarbenbildes, d.h. auf Grundlage des Messergebnisses. Ohne Datenverarbeitung könnten die Spektren nicht in die beiden Klassen eingeteilt werden. Anders als in der Simulation beziehen sich hier die Farben nicht auf die tatsächliche, im Goldstandard gezeigte Gewebeart, sondern auf die spätere Schwellwert-Klassifikation. Die tatsächliche, durch den Goldstandard festgelegte Gewebeart, wird durch das Symbol (Kreis bzw. Kreuz) gekennzeichnet. Darauf wird an späterer Stelle in diesem Abschnitt eingegangen.

Die in Abbildung 4.16d gezeigten unterschiedlichen mittleren Absorbanzen²¹ der Spektren entstehen aufgrund von Wasserschichtdickenvariation, wie in Abschnitt 4.2.7 erläutert wird. Dort wird ebenfalls darauf eingegangen, weshalb eine Gewebedifferenzierung trotz dieser Wasserschichtdickenvariation möglich ist.

Abbildung 4.16e zeigt das Streudiagramm der Absorbanzen bei den Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} für Lage 1. Aufgrund der farblichen Codierung ist zu erkennen, dass die Spektren der beiden Klassen im Streudiagramm räumlich voneinander getrennt sind. Zur Beschreibung der räumlichen Trennung sind allerdings die gezeigten zwei Dimensionen (Absorbanzen bei 1400 cm^{-1} und bei 1080 cm^{-1}) notwendig, weswegen die in Abschnitt 3.3.2 beschriebene Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf diesen Datensatz angewendet wurde; das Ergebnis findet sich in Abbildung 4.17a. Tumor- und Normalgewebe können nun mithilfe einer einzigen Dimension (PC2) unterschieden werden. PC1 hingegen wird vor allem bestimmt durch die Wasserschicht-

²⁰Der in Abbildung 4.16d gezeigte Absorptionspeak bei 1400 cm^{-1} kann aufgrund einer gewissen spektralen Überlappung der Laserkavitäten an dieser Stelle sowohl wie hier gezeigt durch die zweite Kavität als auch durch die erste Kavität dargestellt werden. Aufgrund der variierenden Start- und Zielwellenzahlen des Lasers wird dieser Wellenzahlbereich jedoch nicht immer auch durch die erste Kavität dargestellt, weswegen hier die zweite Kavität zur Darstellung verwendet wird. Aufgrund der in Abschnitt 4.2.9 beschriebenen kavitätsabhängigen Strahllageschwankungen stimmen die durch die unterschiedlichen Kavitäten gemessenen Absorbanzen bei der gleichen Wellenzahl nicht immer überein (s. Abbildung 4.28). Es werden daher, soweit vorhanden, in der Auswertung die bei 1400 cm^{-1} gemessenen Absorbanzen beider Kavitäten betrachtet und die maximale für die Datenanalyse verwendet. Daher kann es zu leichten Unterschieden zwischen der Darstellung der 64 Spektren und den dazugehörigen Werten im Streudiagramm (Abbildung 4.16e) kommen.

²¹Die in der Simulation berechneten Absorbanzwerte (s. z.B. Abbildung 4.8a) sind etwas niedriger als die hier in Abbildung 4.16d gezeigten. Jedoch sind die Simulationswerte im Vergleich zu anderen im Folgenden beschriebenen Gewebemessungen (s. z.B. Abbildung 4.19d) etwas höher. In der Simulation wurden daher Werte verwendet, die sich in der Mitte zwischen Messungen bewegen bei denen hohe Absorbanzen und solchen, bei denen niedrige Absorbanzen ermittelt wurden. Auf Gründe für Absorbanzunterschiede zwischen den Spektren wird im Laufe des Abschnitts eingegangen.

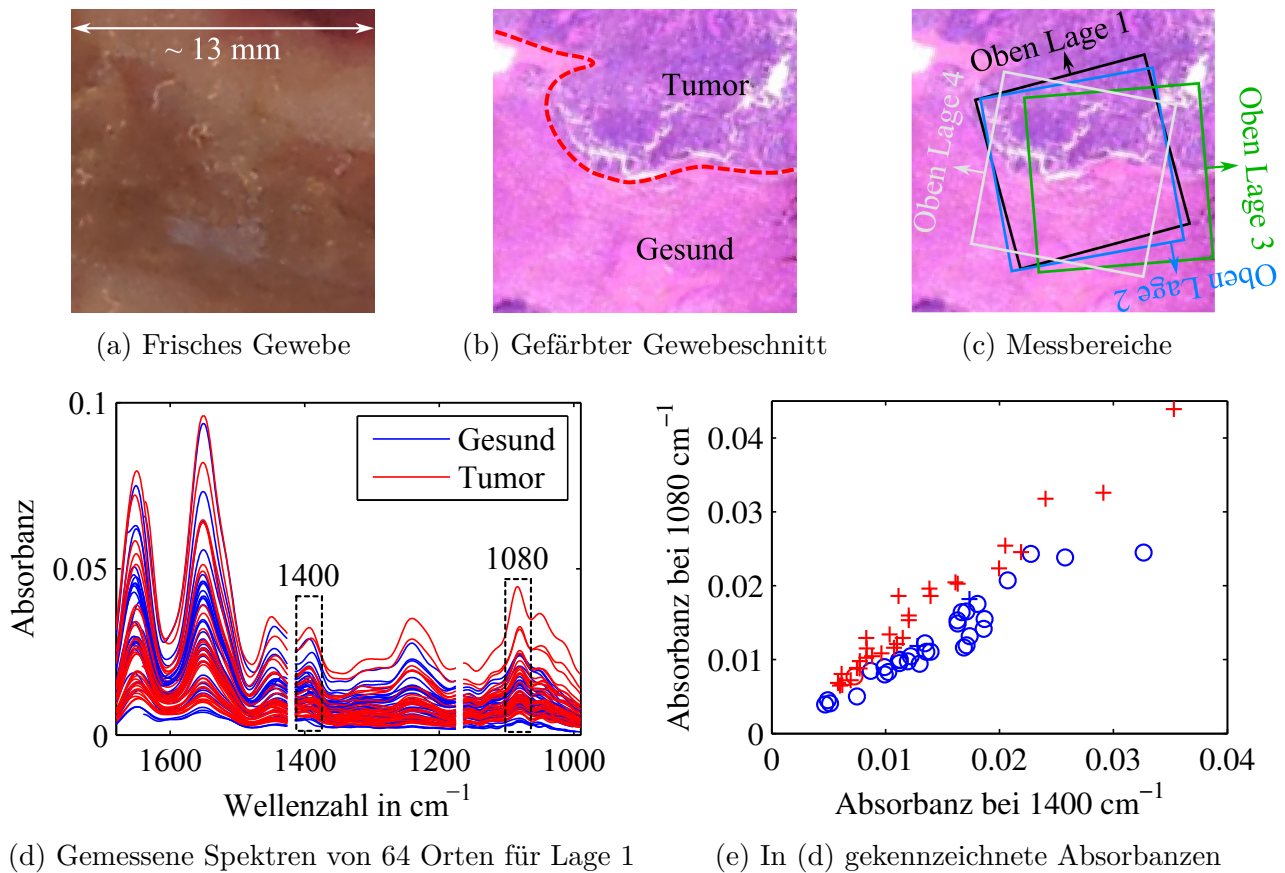


Abbildung 4.16: **(a)** Fotografie des gemessenen ersten Gallengangsgewebes in frischem Zustand. **(b)** Fotografie des *nach* der Messung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitts; der Ausschnitt entspricht in etwa dem in (a) gezeigten; die rote Linie zeigt die vom Pathologen eingezeichnete Grenze zwischen Tumor- und gesundem Bereich. **(c)** Das in (a) gezeigte frische Gewebe wurde in den eingezeichneten vier verschiedenen Lagen auf dem ATR-Kristall gemessen. Die Messbereiche haben eine Größe von jeweils $8 \times 8 \text{ mm}^2$. **(d)** Alle in Lage 1 gemessenen 64 Spektren des ersten Gallengangsgewebes. **(e)** Streudiagramm der Absorbanzen bei den in (d) gekennzeichneten Wellenzahlen. Die farbliche Codierung in (d) und (e) bezieht sich zu Darstellungszwecken auf das in Abbildung 4.17b gezeigte resultierende hyperspektrale Falschfarbenbild; vor der Datenverarbeitung ist diese Zuordnung der Spektren zu den Klassen „Tumor“ (rot) bzw. „Gesund“ (blau) noch nicht möglich; durch die farbliche Darstellung ist zu erkennen, dass sich die Spektren der beiden Klassen überschneiden, d.h. keine der beiden Klassen weist eine wesentlich höhere mittlere Absorbanz auf als die andere. Wie in Abschnitt 4.2.7 erläutert, wird die mittlere Absorbanz vor allem durch die Wasserschichtdicke zwischen Kristall und Probe bestimmt. Unterschiedliche Wasserschichtdicken sind somit kein unmittelbares Kriterium für die hier gezeigte Klassifikation (s. Abschnitt 4.2.7).

dickenvariation und enthält somit im Gegensatz zu PC2 keine für die Gewebeunterscheidung relevante Information; dies wird in Abschnitt 4.2.7 näher erläutert.

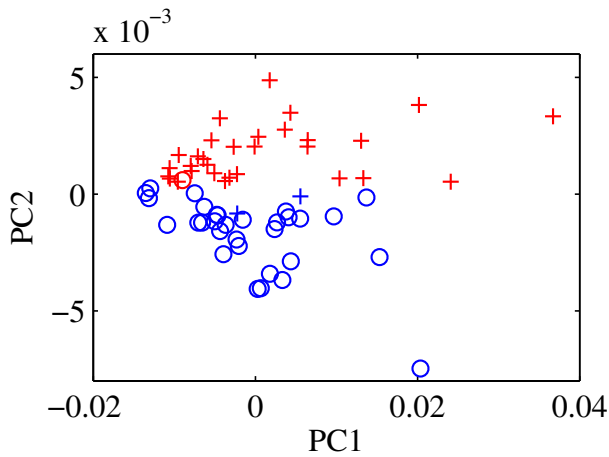
Auf Grundlage des in Abbildung 4.17a gezeigten Ergebnisses der Hauptkomponentenanalyse werden die in Abbildung 4.17b dargestellten hyperspektralen Bilder erstellt. Dies geschieht, indem jeder in Abbildung 4.17a gezeigte Datenpunkt seinem Messort und somit seinem Pixel im Bild zugeordnet wird (s. Abschnitt 3.3.2). Die Graustufen bzw. Farben der jeweiligen Pixel werden dabei bestimmt durch skalare Werte, die sich in dem hier gezeigten Fall aus den jeweiligen PC2-Werten wie folgt ergeben:

Für das Graustufenbild berechnen sich die Grauwerte wie erwähnt aus den mittleren 50 % der PC2-Werte (s. Abschnitt 4.2.1). Das Falschfarbenbild hingegen ergibt sich durch manuelles Setzen eines Schwellwerts für PC2, um eine mögliche Klassifikation zu zeigen (s. Abschnitt 4.2.1); automatisiertes Schwellwertsetzen kann in Zukunft durch aufwändigere Datenverarbeitung erfolgen (s. Kapitel 5).

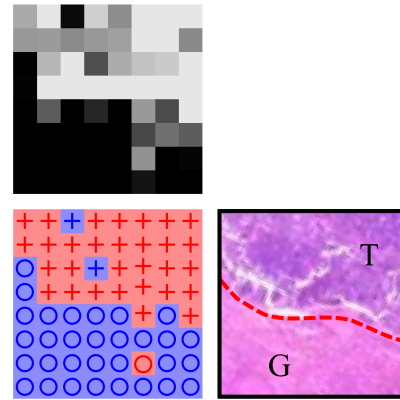
Bei dem in Abbildung 4.17b gezeigten Falschfarbenbild sind die Symbole aus Abbildung 4.17a zum besseren Verständnis den einzelnen Pixeln zugeordnet. Dadurch wird die zuvor erwähnte Nomenklatur verdeutlicht: Pixel, die von Pixeln einer anderen Klasse umgeben und durch den Goldstandard nicht bestätigt sind, werden hier als falsch klassifiziert angenommen. Falsch klassifizierte Pixel werden in den Streudiagrammen der Absorbanzen und der Hauptkomponentenanalysen durch das *Symbol* (Kreis bzw. Kreuz) der jeweils anderen Klasse, d.h. der *tatsächlichen* Gewebeart, beschrieben; die *Farbe* hingegen entspricht der *berechneten* Klassifikation. Auf Gründe der falschen Klassifikation wird in Abschnitt 4.2.9 eingegangen.

Analog zu den Abbildungen 4.17a und 4.17b enthalten die Abbildungen 4.17c bis 4.18d Ergebnisse für die drei weiteren in Abbildung 4.16c gezeigten Lagen des Gewebes auf dem Kristall. Es ist zu sehen, dass eine Gewebedifferenzierung in allen vier Lagen möglich ist und eine Orientierungsabhängigkeit des Messverfahrens nicht vorliegt.

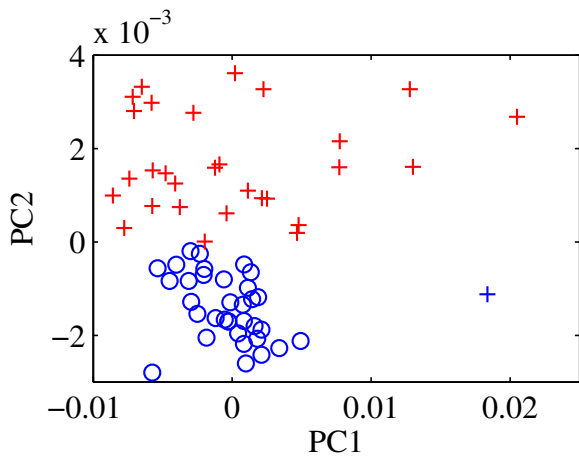
Die PC1- und PC2-Werte in den Streudiagrammen der Hauptkomponentenanalysen variieren für unterschiedliche Messungen unterschiedlich stark. Dies ist vermutlich das Ergebnis unterschiedlicher Wasserschichtdicken zwischen Gewebe und Kristall, wie in Abschnitt 4.2.7 erläutert wird. Ein möglicher Grund dafür ist eine unterschiedlich starke Wasserverdrängung beim Platzieren des Gewebes. Aufgrund der Flexibilität der Proben und der damit verbundenen schwierigen Handhabbarkeit ist ein einheitlicher Platzierungsvorgang schwer durchzuführen. Beispielsweise kann es während der Platzierungsvorgänge zu unterschiedlichen auf das Gewebe ausgeübten Kräften und damit auch zu unterschiedlich starker Wasserverdrängung kommen.



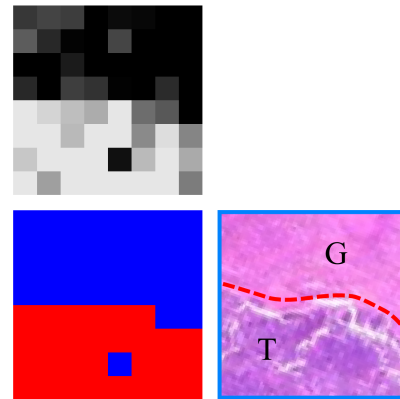
(a) Ergebnis der PCA für Lage 1



(b) Messergebnis Lage 1, Vgl. mit Goldstandard

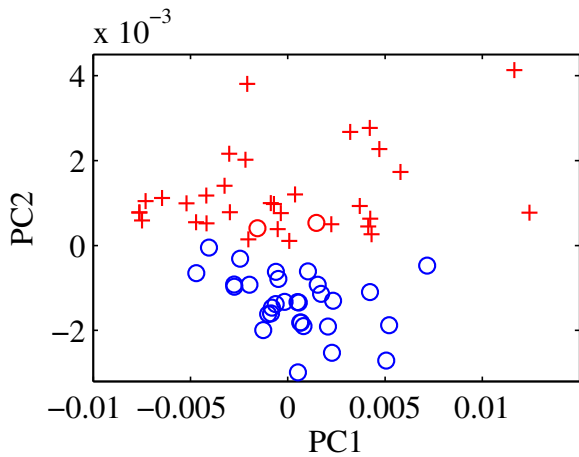


(c) Ergebnis der PCA für Lage 2

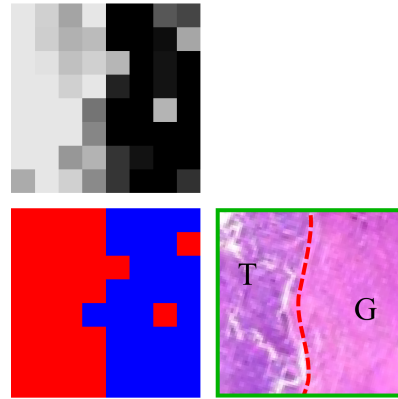


(d) Messergebnis Lage 2, Vgl. mit Goldstandard

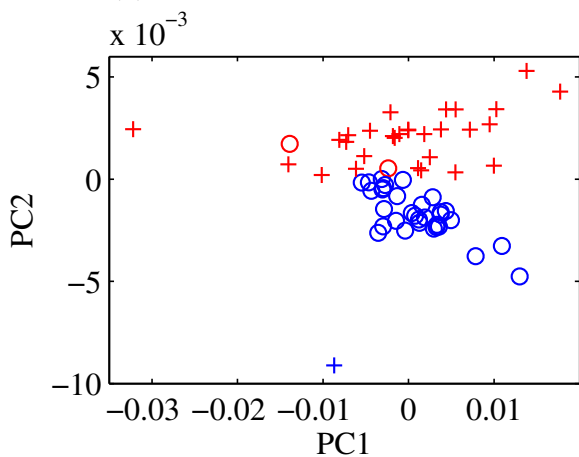
Abbildung 4.17: **(a)** Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der in den Abbildungen 4.16d und 4.16e gezeigten Absorbanzen bei den Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} . Das Vorgehen bei der Hauptkomponentenanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Die erste Dimension PC1 beschreibt hier v. a. die Störgröße örtlich variierender Wasserschichtdicken (s. Abschnitt 4.2.7); anhand der zweiten Dimension PC2 kann Tumor von Normalgewebe unterschieden werden. **(b)** Hyperspektrale Bilder des frischen, ungetrockneten Gallengangsgewebes im Vergleich mit als Goldstandard verwendeten histopathologischen Ergebnissen; das Graustufenbild ergibt sich aus den mittleren 50% der in (a) gezeigten PC2-Werte; das Falschfarbenbild ergibt sich durch Setzen eines Schwellwerts bei $PC2 = 0,5 \times 10^{-3}$, wobei rote Pixel Tumorgewebe darstellen. Zwei Pixel im Tumorbereich wurden durch diese Methode falsch klassifiziert (blaue Pixel umgeben von roten Pixeln); diese sind in (a) und (b) als blaue Kreuze dargestellt. Im gesunden Bereich wurde ein Pixel falsch klassifiziert; dieses ist in (a) und (b) als roter Kreis dargestellt. Das prinzipielle Vorgehen zur Berechnung eines hyperspektralen Bildes aus Rohspektren wurde in Abschnitt 3.3.2 gezeigt. **(c)** und **(d)** zeigen analog zu (a) und (b) die Ergebnisse für Lage 2; als Schwellwert für das Falschfarbenbild in (d) wurde $PC2 = 0$ verwendet.



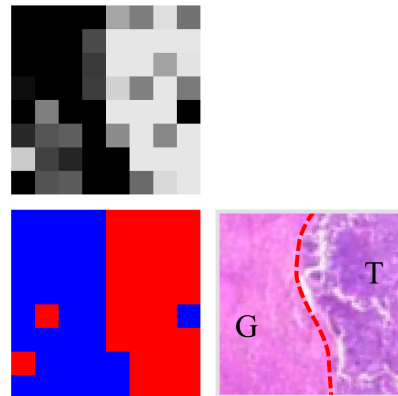
(a) Ergebnis der PCA für Lage 3



(b) Messergebnis Lage 3, Vgl. mit Goldstandard



(c) Ergebnis der PCA für Lage 4



(d) Messergebnis Lage 4, Vgl. mit Goldstandard

Abbildung 4.18: (a) bis (d) zeigen analog zu den Abbildungen 4.17a bis 4.17d die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalysen sowie die gemessenen hyperspektralen Bilder des frischen Gallengangsgewebes für die Lagen 3 und 4; als Schwellwerte für die Falschfarbenbilder in (b) bzw. (d) wurden $PC2 = 0$ bzw. $PC2 = 1,3 \times 10^{-5}$ verwendet. Auf Gründe für falsche Klassifikation wird in Abschnitt 4.2.9 eingegangen.

4.2.3 Ergebnisse der Messung eines zweiten Gallengangskarzinoms der Leber

Abbildung 4.19a zeigt eine Fotografie des zweiten Gallengangsgewebes im gemessenen frischen Zustand. Das Gewebe stammt vom selben Organ desselben Tieres wie das im letzten Abschnitt 4.2.2 beschriebene. Analog zu Abbildung 4.16b zeigt Abbildung 4.19b die Tumorgrenze im histopathologischen Schnitt. Da die Richtungsunabhängigkeit des Messverfahrens in Abschnitt 4.2.2 demonstriert wurde, erfolgte für das in dem vorliegenden Abschnitt beschriebene Gewebe eine zweimalige Messung in derselben Lage, um den zeitlichen Einfluss zu zeigen (s. Abbildung 4.19c). Das Gewebe wurde zwischen den Messungen nicht neu positioniert oder befeuchtet.

Abbildung 4.19d zeigt die in der ersten Lage aufgenommenen 64 Spektren²². Im dazugehörigen Streudiagramm in Abbildung 4.19e ist zu sehen, dass die roten Werte der Tumorspektren eine geringere Streuung als die blauen Werte des gesunden Gewebes aufweisen; Gleiches gilt für das in Abbildung 4.20a gezeigte Streudiagramm der Hauptkomponentenanalyse. Der Grund dafür sind vermutlich systematische Wasserschichtdickenvariationen, wie in Abschnitt 4.2.7 näher beschrieben. Dort wird auch darauf eingegangen, dass diese systematischen Variationen keinen unmittelbaren Einfluss auf die Gewebedifferenzierung haben.

In Abbildung 4.20d ist das Ergebnis der zweiten Messung gezeigt. Die Streudiagramme der Abbildungen 4.20a und 4.20c weisen in Bezug auf die relative Verteilung der Werte Ähnlichkeiten auf, die dazugehörigen Falschfarbenbilder unterscheiden sich in lediglich einem Pixel. Der Grund für die unterschiedliche Klassifikation dieses Pixels ist vermutlich eine bei der zweiten Messung geringere Wasserschicht (s. Abschnitt 4.2.7), die daraus resultiert, dass das Gewebe für die zweite Messung nicht neu befeuchtet wurde.

Da das Gewebe zwischen den beiden Messungen nicht verändert wurde, zeigen die fast identischen Falschfarbenbilder die Konstanz der Messbedingungen auch über einen längeren Zeitraum.

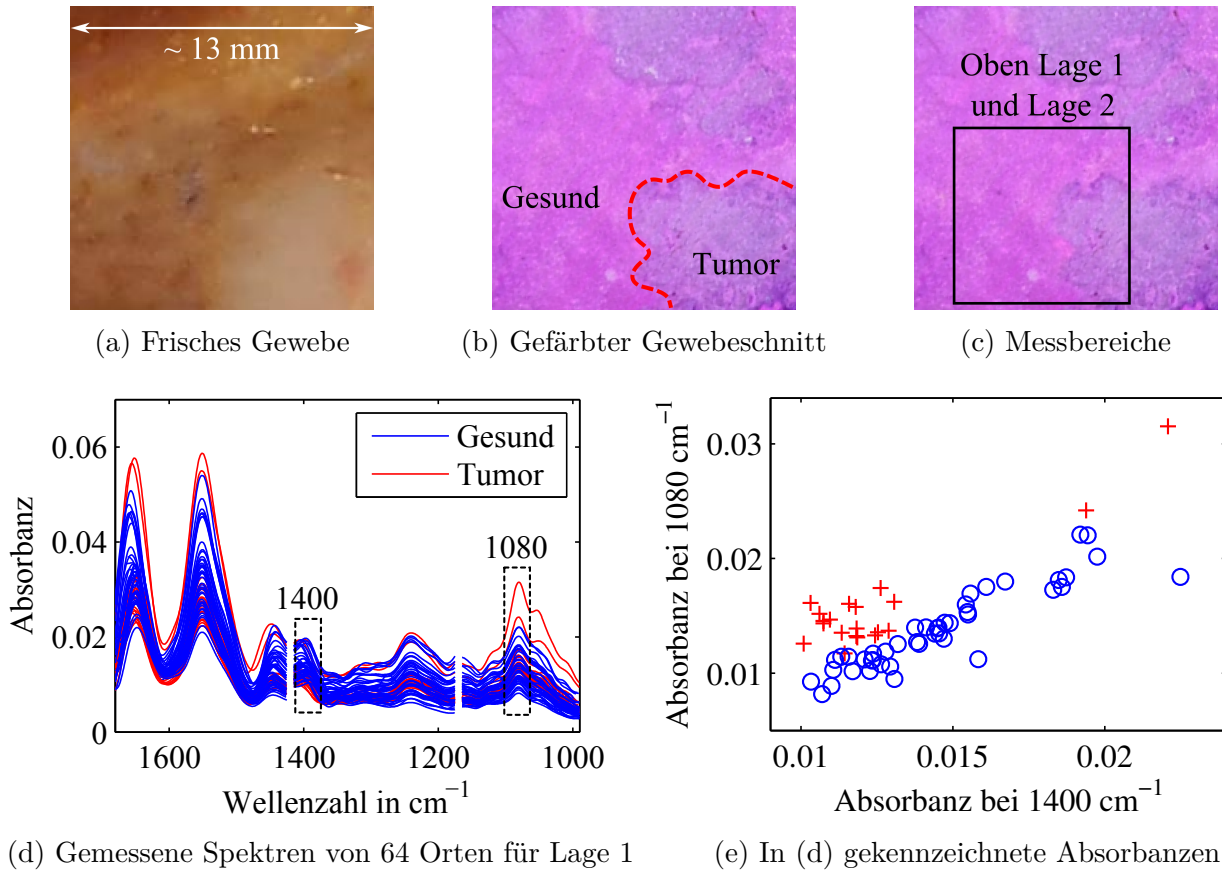
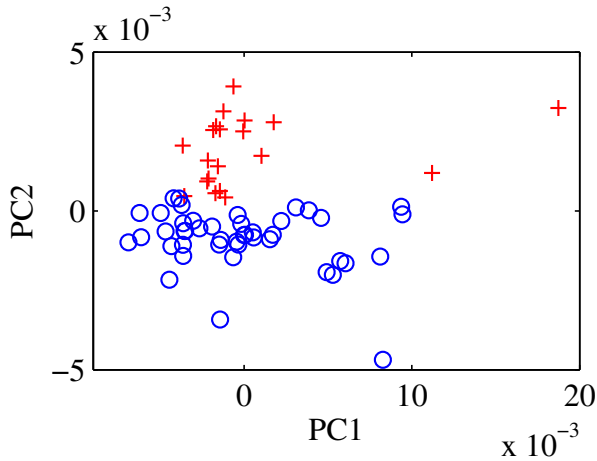
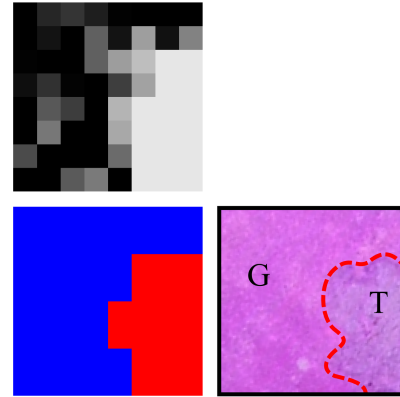


Abbildung 4.19: **(a)** Fotografie des gemessenen zweiten Gallengangsgewebes in frischem Zustand. **(b)** Fotografie des nach der Messung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitts; der Ausschnitt entspricht in etwa dem in (a) gezeigten; die rote Linie zeigt die vom Pathologen eingezeichnete Grenze zwischen Tumor- und gesundem Bereich. **(c)** Das in (a) gezeigte frische Gewebe wurde zweimal in der eingezeichneten Lage gemessen; das Gewebe wurde zwischen den Messungen nicht bewegt oder befeuchtet. Der Messbereich hat eine Größe von $8 \times 8 \text{ mm}^2$.

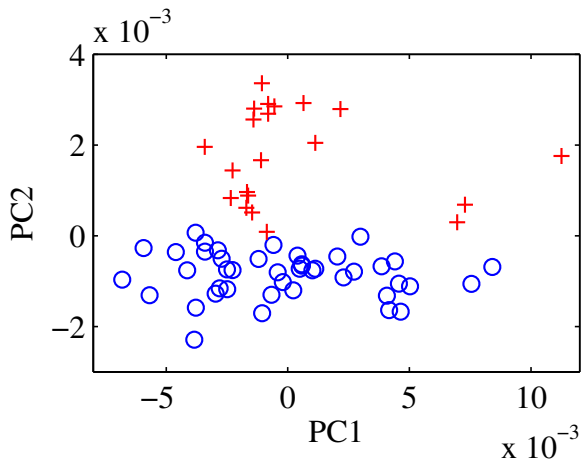
(d) Alle in Lage 1 gemessenen 64 Spektren des zweiten Gallengangsgewebes. **(e)** Streudiagramm der Absorbanzen bei den in (d) gekennzeichneten Wellenzahlen. Die farbliche Codierung in (d) und (e) bezieht sich zu Darstellungszwecken auf das in Abbildung 4.20b gezeigte resultierende hyperspektrale Falschfarbenbild; die Tumorwerte (rot) zeigen eine stärkere Gruppierung; in Abbildung 4.27 wird jedoch gezeigt, dass dies keinen unmittelbaren Einfluss auf die Gewebedifferenzierung hat.



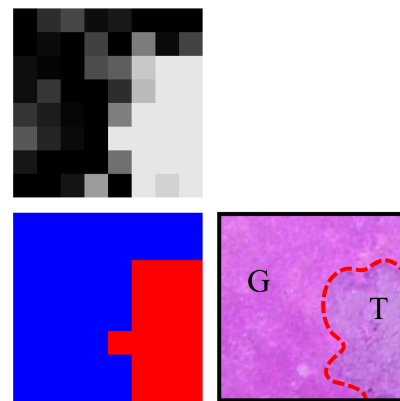
(a) Ergebnis der PCA für Lage 1



(b) Messergebnis Lage 1, Vgl. mit Goldstandard



(c) Ergebnis der PCA für Lage 2



(d) Messergebnis Lage 2, Vgl. mit Goldstandard

Abbildung 4.20: **(a)** Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der in den Abbildungen 4.19d und 4.19e gezeigten Absorbanzen bei den Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} . **(b)** Hyperspektrale Bilder des frischen, ungetrockneten zweiten Gallengangsgewebes im Vergleich mit als Goldstandard verwendeten histopathologischen Ergebnissen; das Falschfarbenbild ergibt sich durch Setzen eines Schwellwerts bei $\text{PC2} = 4,9 \times 10^{-4}$. **(c)** und **(d)** zeigen analog zu **(a)** und **(b)** die Ergebnisse für Lage 2, die identisch zu Lage 1 ist; als Schwellwert für das Falschfarbenbild in **(d)** wurde $\text{PC2} = 3 \times 10^{-4}$ verwendet. Die Ergebnisse von Lage 1 und Lage 2 sind vergleichbar; die Streuung der Werte in **(c)** ist geringer als in **(a)**, vermutlich aufgrund einer geringeren Wasserschichtdicke (s. Abschnitt 4.2.7).

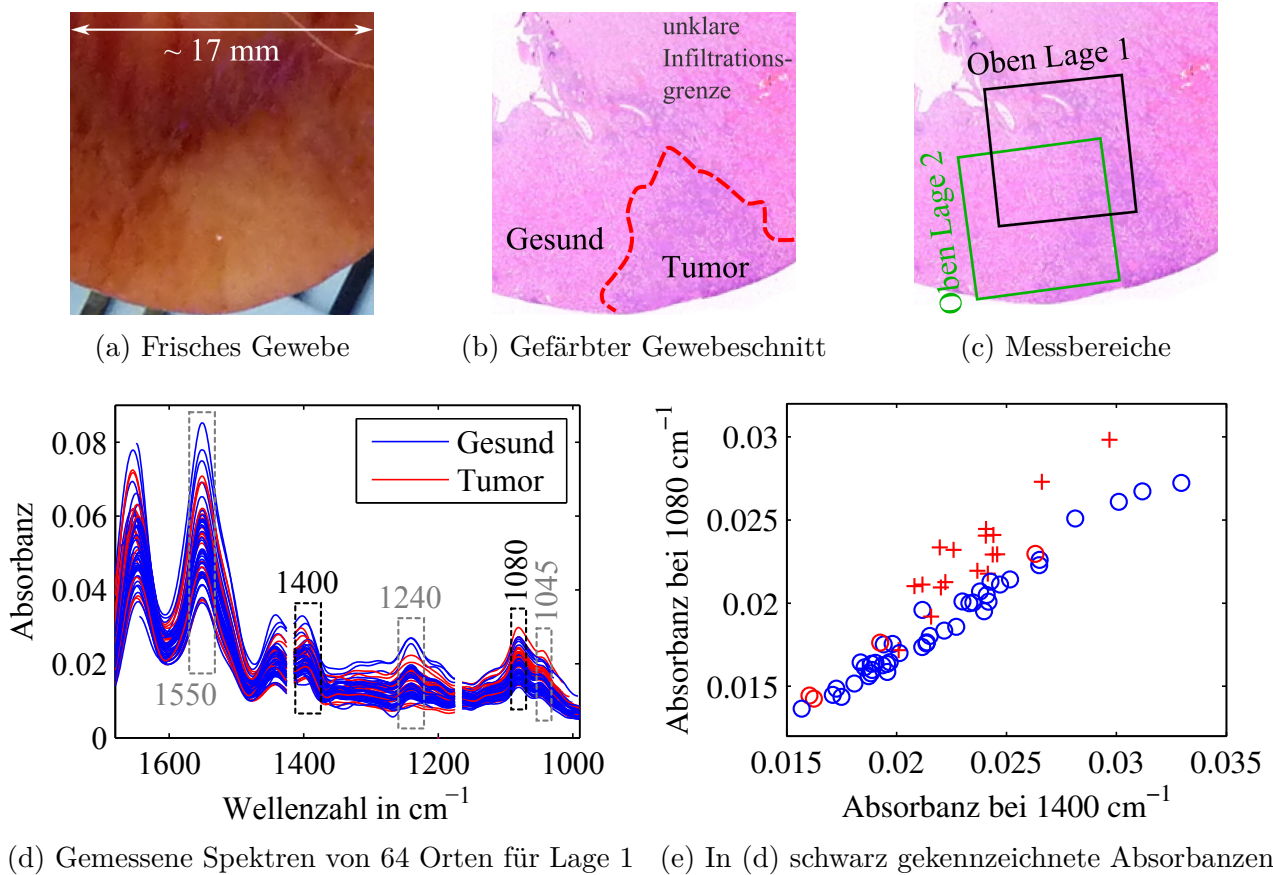


Abbildung 4.21: **(a)** Fotografie des gemessenen Nierengewebes in frischem Zustand. **(b)** Fotografie des nach der Messung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitts; der Ausschnitt entspricht in etwa dem in (a) gezeigten; die rote Linie zeigt die vom Pathologen eingezeichnete Grenze zwischen Tumor- und gesundem Bereich, wobei auf eine unklare Infiltrationsgrenze hingewiesen wurde; in den weißen Bereichen der gefärbten Schnitte ist kein Gewebe vorhanden, im Gegensatz zu dem in (a) gezeigten frischen Zustand. **(c)** Das in (a) gezeigte frische Gewebe wurde in den eingezeichneten zwei Lagen gemessen. **(d)** Alle in Lage 1 gemessenen 64 Spektren des Nierengewebes. **(e)** Streudiagramm der Absorbanzen bei den in (d) schwarz gekennzeichneten Wellenzahlen. Für die Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse wurden zusätzlich die in (d) grau gekennzeichneten Wellenzahlen 1550 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} und 1045 cm^{-1} verwendet.

4.2.4 Ergebnisse der Messung eines Adenokarzinoms der Niere

Abbildung 4.21a zeigt eine Fotografie des Nierengewebes im gemessenen frischen Zustand, Abbildung 4.21b die Tumorgrenze im histopathologischen Schnitt. Die Abgrenzung des gesunden vom tumorösen Gewebe ist hier laut Pathologe aufgrund einer „unklaren Infiltrationsgrenze“ nicht eindeutig, jedoch gibt die eingezeichnete Linie die Grenze in etwa wieder. Die zwei gemessenen Lagen sind in Abbildung 4.21c gezeigt.

Abbildung 4.21d zeigt die in Lage 1 gemessenen 64 Spektren. Rechts in Abbildung 4.21e gezeigt ist das Streudiagramm der beiden Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} , die zur Gewebedifferenzierung im Falle des Gallengangsgewebes verwendet wurden. Zu sehen ist, dass die später als Tumor- und Normalgewebe klassifizierten Werte in dem Streudiagramm nicht räumlich voneinander getrennt sind. Es wurden daher weitere Wellenzahlen, in Abbildung 4.21d grau hervorgehoben, in die Auswertung mit einbezogen. Dies ermöglichte eine Verbesserung der Ergebnisse²³ im Vergleich zur Verwendung von lediglich zwei Wellenzahlen. Auf die Verwendung unterschiedlicher Wellenzahlen wird in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.8 eingegangen.

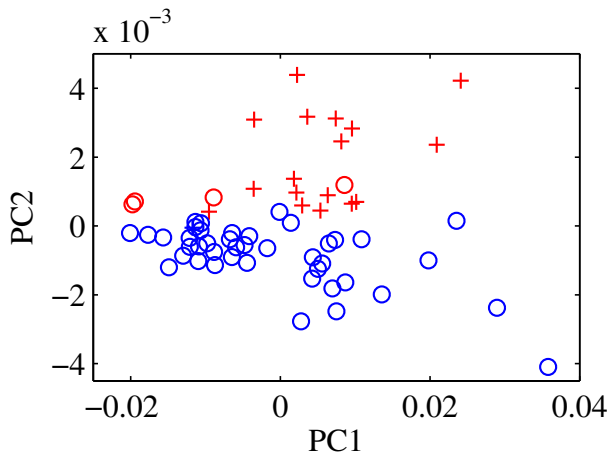
Das in Abschnitt 3.3.2 beschriebene Verfahren der Hauptkomponentenanalyse für den zweidimensionalen Fall wird daher hier um drei weitere Dimensionen (drei weitere Wellenzahlen) erweitert. Das prinzipielle Vorgehen der Analyse ist jedoch identisch²⁴; zudem werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wie im zweidimensionalen Fall nur die ersten beiden resultierenden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) betrachtet. Diese sind in Abbildung 4.22a gezeigt. Zu sehen ist, dass durch Verwendung zusätzlicher Wellenzahlen im Vergleich zu Abbildung 4.21e eine räumliche Trennung der Klassen in PC2-Richtung möglich ist.

Wie zuvor erwähnt, werden hier als falsch klassifizierte Pixel solche betrachtet, die von Pixeln einer anderen Klasse umgeben sind. Das in Abbildung 4.22b gezeigte hyperspektrale Falschfarbenbild zeigt im Vergleich mit dem Goldstandard vier solcher falsch klassifizierter roter, d.h. Tumorpixel, sowie ein falsch klassifiziertes blaues Pixel. Die vier falsch klassifizierten Tumorpixel sind allerdings vor dem Hintergrund der vom Pathologen erwähnten unklaren Infiltrationsgren-

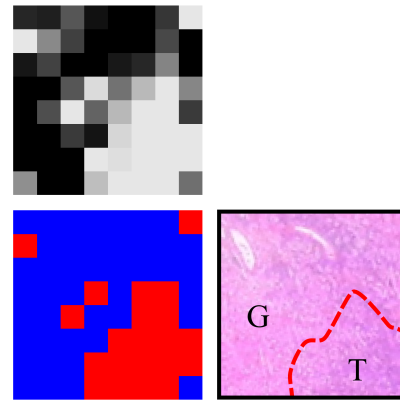
²²Die Darstellung wird von blauen Spektren gesunden Gewebes dominiert. Die Gründe dafür sind, dass zum einen bei dieser Messung mehr Pixel gesunden Gewebes vorliegen und dass zum anderen die Spektren der einzelnen Orte in der Reihenfolge von rechts unten nach links oben angezeigt werden, bezogen auf das in Abbildung 4.20b gezeigte Falschfarbenbild. Da sich die roten Tumorpixel im Falschfarbenbild rechts unten befinden und daher die korrespondierenden roten Tumorspektren zuerst ausgegeben werden, sind diese von den blauen Spektren überdeckt.

²³Bei der Auswertung des in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Gallengangsgewebes wurden die Ergebnisse bei Verwendung der hier gezeigten zusätzlichen Wellenzahlen nicht verbessert, sondern eher verschlechtert.

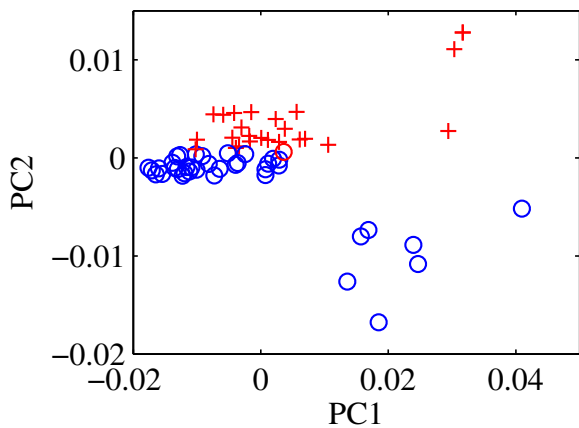
²⁴In dem fünfdimensionalen Raum wird zunächst die Richtung maximaler Varianz berechnet (PC1); anschließend wird von den Richtungen, die senkrecht auf PC1 stehen, diejenige ermittelt, welche von diesen die höchste Varianz zeigt (PC2) [Kes07, S. 27].



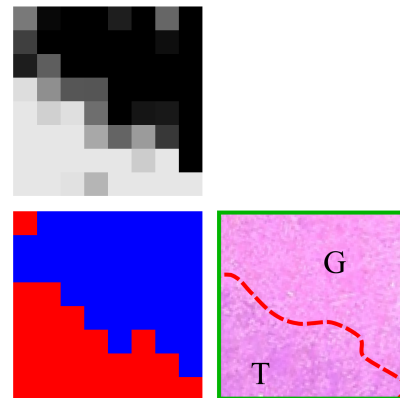
(a) Ergebnis der PCA für Lage 1



(b) Messergebnis Lage 1, Vgl. mit Goldstandard



(c) Ergebnis der PCA für Lage 2



(d) Messergebnis Lage 2, Vgl. mit Goldstandard

Abbildung 4.22: **(a)** Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der in Abbildung 4.21d hervorgehobenen Maxima der Absorbanzen bei den ungefähren Wellenzahlen 1550 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} und 1045 cm^{-1} . **(b)** Hyperspektrale Bilder des frischen, ungetrockneten Nierengewebes im Vergleich mit als Goldstandard verwendeten histopathologischen Ergebnissen; das Falschfarbenbild ergibt sich durch Setzen eines Schwellwerts bei $\text{PC2} = 4,1 \times 10^{-4}$. **(c)** und **(d)** zeigen analog zu **(a)** und **(b)** die Ergebnisse für Lage 2; als Schwellwert für das Falschfarbenbild in **(d)** wurde $\text{PC2} = 6 \times 10^{-4}$ verwendet.

ze zu betrachten, d.h. u. U. befinden sich auch einzelne Tumorbereiche in dem als „gesund“ markierten Abschnitt; davon ist jedoch nicht zwingend auszugehen.

Abbildung 4.22d zeigt analog zu Abbildung 4.22b die Messung des Gewebes in einer zweiten Lage mit veränderter Orientierung und Position. In dem in Abbildung 4.22d gezeigten gefärbten Gewebeschnitt scheint für den in der zweiten Lage gemessenen Gewebeausschnitt die Unterscheidung zwischen gesunden und tumorösen Bereichen auch mit dem Auge klarer. Im resultierenden Falschfarbenbild sind weniger Pixel falsch klassifiziert als bei der Messung der ersten Lage.

4.2.5 Ergebnisse der Messung einer Karzinometastase der Lunge

Abbildung 4.23a zeigt eine Fotografie des Lungengewebes im gemessenen frischen Zustand. Der Tumor scheint hier zunächst mit dem Auge gut abgrenzbar vom gesunden Gewebe, jedoch gibt es Areale, die nicht eindeutig sind, wie z.B. leicht weißliche Übergangsbereiche am linken Rand der Fotografie. Abbildung 4.23b zeigt im Vergleich dazu die Tumorgrenze im histopathologischen Schnitt. Wie zuvor erwähnt, ist eine hundertprozentige Übereinstimmung der Ansicht des frischen Gewebes mit dem histopathologischen Schnitt nicht gewährleistet, da flexibles Gewebe seine Form zwischen Messung und Anfertigung des Schnittes leicht verändern kann. Das Gewebe wurde in den in Abbildung 4.23c gezeigten zwei verschiedenen Lagen unterschiedlicher Position, aber ähnlicher Orientierung gemessen.

Abbildung 4.23d zeigt die in Lage 1 gemessenen 64 Spektren. Rechts in Abbildung 4.23e ist das Streudiagramm der beiden Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} zu sehen, die zur Gewebedifferenzierung im Falle des Gallengangsgewebes verwendet wurden. Wie bei dem im letzten Abschnitt 4.2.4 beschriebenen Nierengewebe sind die später als Tumor- und gesundes Gewebe klassifizierten Werte im Streudiagramm dieser beiden Wellenzahlen nicht räumlich voneinander getrennt. Es wurde daher zusätzlich die Wellenzahl 1550 cm^{-1} in die Auswertung mit einbezogen, die in Abbildung 4.23d grau hervorgehoben ist²⁵. Auf die Verwendung unterschiedlicher Wellenzahlen wird in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.8 eingegangen.

Die Hauptkomponentenanalyse ergibt, wie in Abbildung 4.24a gezeigt, eine Trennung der Werte, die im Falschfarbenbild in Abbildung 4.24b den beiden Klassen „Tumor“ und „Gesund zugeordnet“ werden.

Abbildung 4.24d zeigt das Ergebnis der zweiten Messung. Auf die falsch klassifizierten Pixel, die

²⁵Diese drei Wellenzahlen ermöglichten eine bessere Unterscheidung als die im Falle des Nierengewebes fünf verwendeten Wellenzahlen.

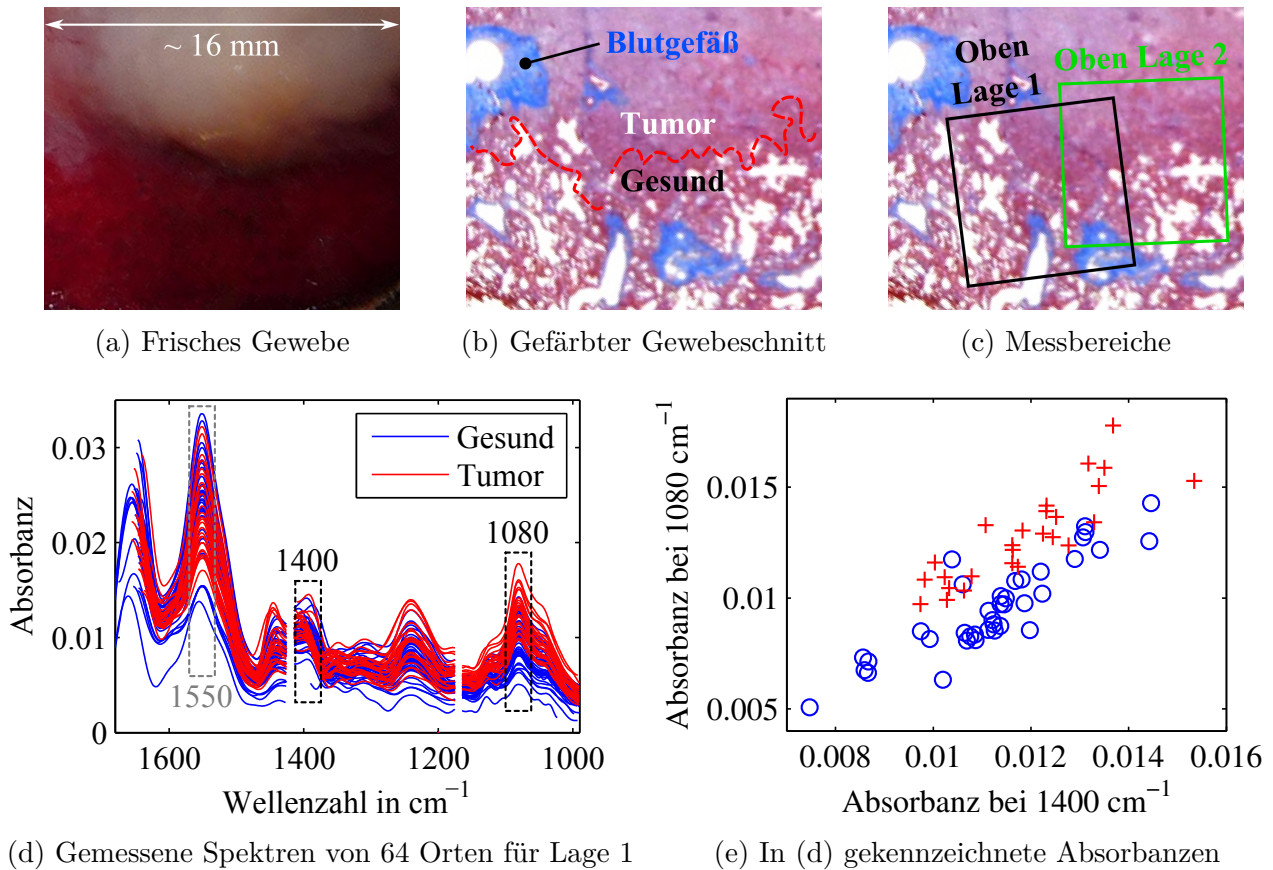
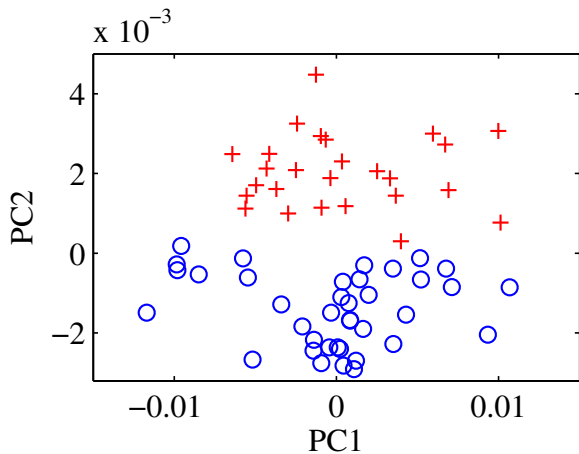
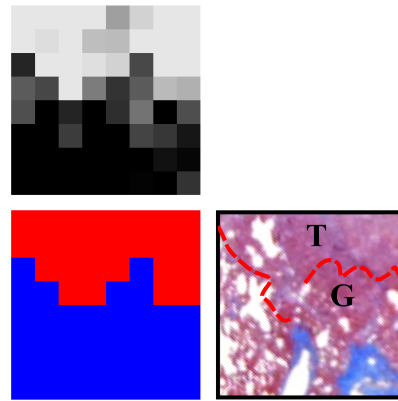


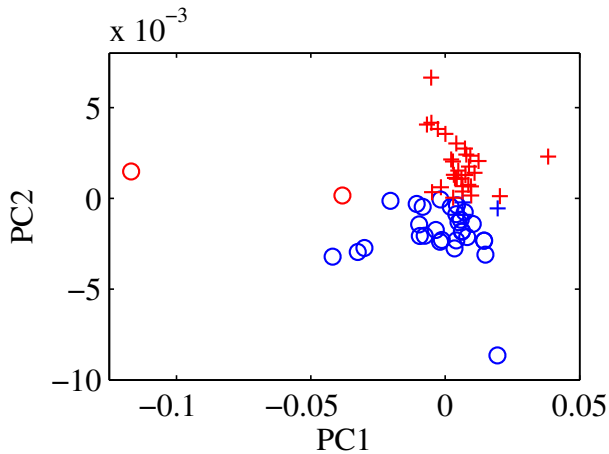
Abbildung 4.23: **(a)** Fotografie des gemessenen Lungengewebes in frischem Zustand. **(b)** Fotografie des nach der Messung mit Masson-Trichrom gefärbten Gewebeschnitts; der Ausschnitt entspricht in etwa dem in (a) gezeigten; die rote Linie zeigt die vom Pathologen eingezeichnete Grenze zwischen Tumor- und gesundem Bereich; in den weißen Bereichen der gefärbten Schnitte ist kein Gewebe vorhanden, im Gegensatz zu dem in (a) gezeigten frischen Zustand. **(c)** Das in (a) gezeigte frische Gewebe wurde in den eingezeichneten zwei Lagen gemessen. **(d)** Alle in Lage 1 gemessenen 64 Spektren des Lungengewebes. Mehrere Spektren beginnen erst bei etwa 1650 cm^{-1} ; dies resultiert aus variierenden Startwellenzahlen des QCL-Systems. **(e)** Streudiagramm der Absorbanzen bei den in (d) schwarz gekennzeichneten Wellenzahlen. Für die Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse wurde zusätzlich die in (d) grau gekennzeichnete Wellenzahl 1550 cm^{-1} verwendet.



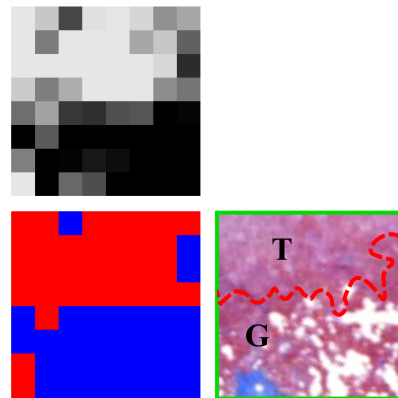
(a) Ergebnis der PCA für Lage 1



(b) Messergebnis Lage 1, Vgl. mit Goldstandard



(c) Ergebnis der PCA für Lage 2



(d) Messergebnis Lage 2, Vgl. mit Goldstandard

Abbildung 4.24: **(a)** Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der in Abbildung 4.23d hervorgehobenen Maxima der Absorbanzen bei den ungefähren Wellenzahlen 1550 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} . **(b)** Hyperspektrale Bilder des frischen, ungetrockneten Lungengewebes im Vergleich mit als Goldstandard verwendeten histopathologischen Ergebnissen; das Falschfarbenbild ergibt sich durch Setzen eines Schwellwerts bei $\text{PC2} = 2 \times 10^{-4}$. **(c)** und **(d)** zeigen analog zu **(a)** und **(b)** die Ergebnisse für Lage 2; als Schwellwert für das Falschfarbenbild in **(d)** wurde $\text{PC2} = 6,5 \times 10^{-5}$ verwendet.

vor allem aus den in Abbildung 4.24c zu sehenden Ausreißern resultieren, wird in Abschnitt 4.2.9 eingegangen.

4.2.6 Ergebnisse der Messung eines neuroendokrinen Karzinoms des Hirns

Abbildung 4.25a zeigt eine Fotografie des neuroendokrinen Hirngewebes im gemessenen frischen Zustand, Abbildung 4.25b die Grenze zwischen Tumor- und gesundem Gewebe (weiße Gehirnschicht) im histopathologischen Schnitt. Das Gewebe wurde in den zwei in Abbildung 4.25c gezeigten Lagen gemessen.

Abbildung 4.25d zeigt die in Lage 1 gemessenen 64 Spektren. Anders als bei den bisherigen Gewebeuntersuchungen ist hier die Absorption bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} für Tumorgewebe reduziert. Ein möglicher Grund dafür wurde in Abschnitt 1.4.4 beschrieben: Bei 1080 cm^{-1} können erhöhte Nukleinsäuren einen Anstieg, reduzierte Lipidanteile aber auch einen Abfall der Absorption ermöglichen; beides sind mögliche Gründe für spektrale Unterschiede zwischen gesundem und tumorösem Gewebe. Je nach Tumor- bzw. Gewebeart überwiegt einer dieser beiden Effekte. Aus diesem Grund ist es nach [KSSS04] möglich, dass bei manchen Tumoren eine erhöhte Absorption bei 1080 cm^{-1} zu verzeichnen ist, bei anderen eine reduzierte.

Im Streudiagramm in Abbildung 4.25e ist für die Wellenzahlen 1400 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} eine Überschneidung der später klassifizierten Werte zu erkennen, wie auch teilweise bei den Messungen zuvor. Aus diesem Grund wurden zusätzlich die in Abbildung 4.25d grau markierten Wellenzahlen 1550 cm^{-1} und 1240 cm^{-1} in die Auswertung miteinbezogen. Die Gewebedifferenzierung im Goldstandard erfolgte ebenfalls mithilfe einer anderen Färbung als bei den bisherigen Messungen (Picrosirius-Rot statt Masson-Trichrom bzw. Hämatoxylin-Eosin).

Das in Abbildung 4.26b gezeigte Falschfarbenbild gibt die Verhältnisse des Goldstandards im Prinzip wieder. Insbesondere bei diesem, im Vergleich zu den anderen Geweben besonders flexiblen Hirngewebe, können Unterschiede auch auf Formveränderungen in Folge von Handhabung zwischen Messung und Anfertigen des Gewebeschnitts zurückzuführen sein. Gleiches gilt für den Vergleich der Messergebnisse für Lage 1 und Lage 2: Aufgrund der Forminstabilität wurden in Lage 1 und Lage 2 u. U. leicht unterschiedliche Zustände gemessen.

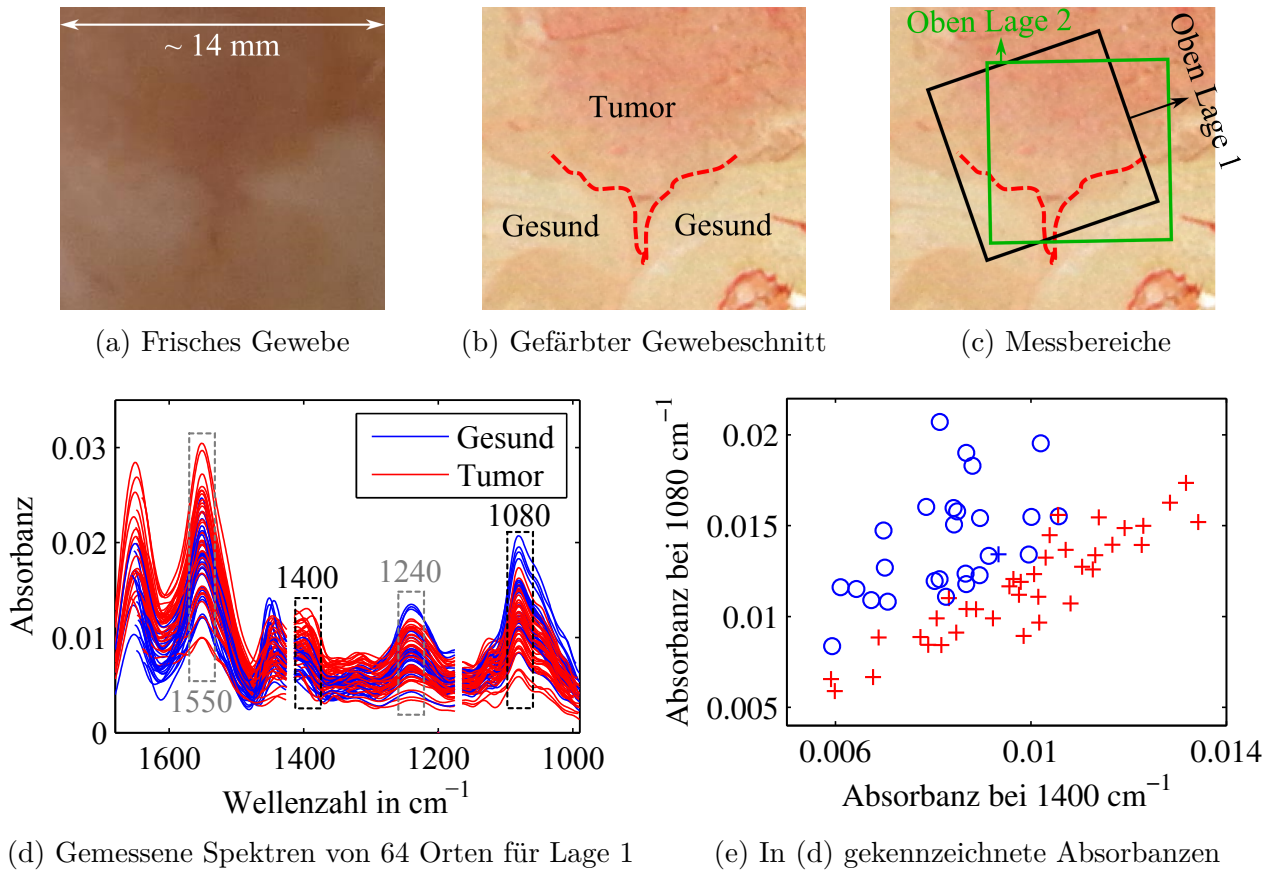
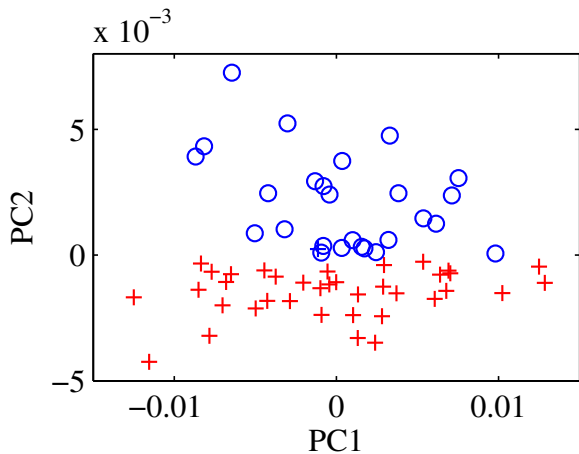
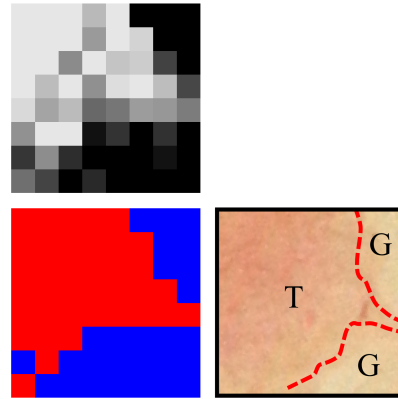


Abbildung 4.25: **(a)** Fotografie des gemessenen Hirngewebes in frischem Zustand. **(b)** Fotografie des nach der Messung mit Picrosirius-Rot gefärbten Gewebeschnitts; der Ausschnitt entspricht in etwa dem in (a) gezeigten; die rote Linie zeigt die vom Pathologen eingezeichnete Grenze zwischen Tumor- und gesundem Bereich; **(c)** Das in (a) gezeigte frische Gewebe wurde in den eingezeichneten zwei Lagen gemessen.

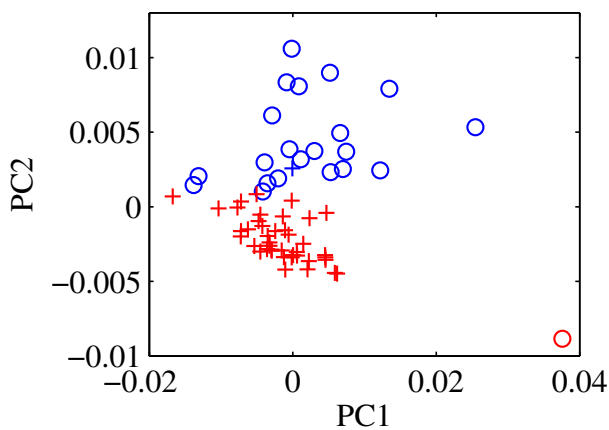
(d) Alle in Lage 1 gemessenen 64 Spektren des endokrinen Hirngewebes. Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen ist die Absorption bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} im Falle von Tumorgewebe reduziert; Gründe dafür finden sich in Abschnitt 1.4.4. **(e)** Streudiagramm der Absorbanzen bei den in (d) schwarz gekennzeichneten Wellenzahlen. Für die Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse wurden zusätzlich die in (d) grau gekennzeichneten Wellenzahlen 1550 cm^{-1} und 1240 cm^{-1} verwendet.



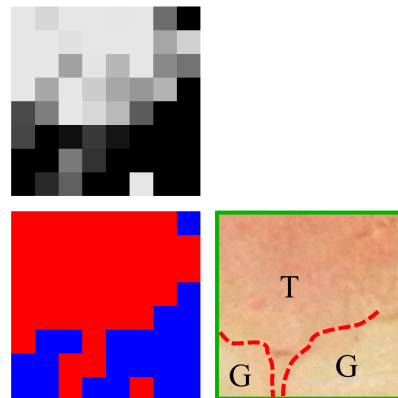
(a) Ergebnis der PCA für Lage 1



(b) Messergebnis Lage 1, Vgl. mit Goldstandard



(c) Ergebnis der PCA für Lage 2



(d) Messergebnis Lage 2, Vgl. mit Goldstandard

Abbildung 4.26: **(a)** Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der in Abbildung 4.25d hervorgehobenen Maxima der Absorbanzen bei den ungefähren Wellenzahlen 1550 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} . **(b)** Hyperspektrale Bilder des frischen, ungetrockneten endokrinen Hirngewebes im Vergleich mit als Goldstandard verwendeten histopathologischen Ergebnissen; das Falschfarbenbild ergibt sich durch Setzen eines Schwellwerts bei $\text{PC2} = 6,21 \times 10^{-5}$. **(c)** und **(d)** zeigen analog zu **(a)** und **(b)** die Ergebnisse für Lage 2; als Schwellwert für das Falschfarbenbild in **(d)** wurde $\text{PC2} = 1 \times 10^{-3}$ verwendet.



(a) Wasserschichtdickenverteilung



(b) Ergebnis der Gewebedifferenzierung

Abbildung 4.27: Vergleich zwischen der ungefähren Wasserschichtdickenverteilung (a) und dem Ergebnis der Gewebedifferenzierung (b). Zwischen den beiden Darstellungen ist keine eindeutige Korrelation zu erkennen. Zur Bestimmung der relativen Wasserschichtdicken wurden die Mittelwerte der Spektren verwendet. Es wurde dabei angenommen, dass der Mittelwert eines Spektrums vor allem durch die Wasserschichtdicke bestimmt wird; dies wird durch die Simulation in Abschnitt 4.1 bestätigt. In der linken Darstellung zeigen helle Pixel Orte hoher Absorbanz und dunkle Pixel Orte niedriger Absorbanz. Wie bei den restlichen Graustufenbildern in diesem Kapitel wurden für die Darstellung die mittleren 50 % der entsprechenden Werte verwendet. Die rot umrandeten Pixel korrespondieren mit den in Abbildung 4.19d gezeigten beiden roten Spektren, die bei 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} die von allen Spektren maximalen Absorbanzen aufweisen. Im Streudiagramm der Abbildung 4.19e werden diese beiden Pixel durch die dort rechts oben zu findenden roten Kreuze beschrieben. Die hier in (b) gezeigte Darstellung ist identisch zu dem in Abbildung 4.20b gezeigten hyperspektralen Graustufenbild.

4.2.7 Einfluss der Wasserschichtdickenvariation

Im Rahmen der Simulation wurde in Abschnitt 4.1.5 gezeigt, dass sich die mittleren Absorbanzen der Spektren vor allem aufgrund von Wasserschichtdickenvariation unterscheiden (s. v. a. Abbildungen 4.9 und 4.12). Da PC1 grundsätzlich die Richtung der maximalen Varianz des betrachteten Datensatzes beschreibt (s. Abschnitt 3.3.2), wird PC1 vor allem durch die Wasserschichtdickenvariation bestimmt (s. Abbildung 4.12). Dies erklärt, weshalb in den letzten Abschnitten PC1 nicht für die Gewebedifferenzierung verwendet wurde.

Mit dem Wissen, dass PC1 vor allem durch Wasserschichtdickenvariation bestimmt wird, kann zudem aus den PCA-Diagrammen der letzten Abschnitte herausgelesen werden, ob *systematische* Variationen der Wasserschichtdicken vorliegen. Sind die Varianzen in PC1-Richtung für die beiden Klassen „Tumor“ und „Gesund“ vergleichbar, so kann auch davon ausgegangen werden, dass die Wasserschichtdicken entsprechend der Annahme in der Simulation über beide Klassen in etwa gleichverteilt sind. Bei den meisten in den letzten Abschnitten gezeigten PCA-Diagrammen ist dies der Fall (s. z.B. Abbildung 4.17a).

Bei bestimmten Diagrammen sind hingegen gewisse Gruppierungen einzelner Klassen zu beobachten. Ein Beispiel dafür ist Abbildung 4.20a. Die roten Werte der Tumorspektren zeigen dort

eine tendenziell geringere Streuung als die blauen Werte des gesunden Gewebes. Der Grund dafür ist in Abbildung 4.27 dargestellt: Werden die Mittelwerte der Absorbanzen der jeweiligen Spektren räumlich verteilt betrachtet, so ergibt sich die in Abbildung 4.27a gezeigte Darstellung. Tendenziell weisen die in der linken unteren Diagonale aufgenommenen Spektren eine hohe mittlere Absorbanz auf, die in der rechten oberen Diagonale eine niedrige. Wie angemerkt, sind die unterschiedlichen mittleren Absorbanzen vor allem auf unterschiedliche Wasserschichtdicken in den entsprechenden Bereichen zurückzuführen. Die Tumorspektren wurden somit bis auf zwei Ausnahmen²⁶ in Bereichen hoher Wasserschichtdicken aufgenommen, die Spektren gesunden Gewebes allerdings sowohl in Bereichen hoher als auch in Bereichen niedriger Wasserschichtdicken. Dadurch wird die geringere Streuung der Tumorwerte erklärt.

Dieses Beispiel zeigt somit, dass trotz des in Abbildung 4.27a gezeigten, vergleichsweise starken systematischen Wassereinflusses, die Pixel in Bezug auf unterschiedliche Gewebearten richtig klassifiziert werden (s. Abbildung 4.27b bzw. 4.20b); es ist dabei keine Korrelation zwischen der Wasserverteilung und der Gewebeklassifikation zu erkennen.

Es gibt also in manchen Fällen stark systematisch variierende Wasserschichtdicken; diese haben jedoch in den im Rahmen der letzten Abschnitte gezeigten Fällen keinen dominanten Einfluss auf die Klassifikation, da die Wasserschichtdickenvariationen vor allem durch PC1 beschrieben werden und PC1 in der Auswertung nicht betrachtet wird. Dies wird zusätzlich bestätigt durch ähnliche Ergebnisse trotz unterschiedlicher Streuungen der PCA-Diagramme untereinander. Ein Beispiel dafür ist der *Vergleich* der beiden unmittelbar hintereinander ausgeführten Messungen in Abschnitt 4.2.3: Die in den Abbildungen 4.20a und 4.20c dargestellten PCA-Diagramme zeigen unterschiedliche Streuungen der Werte. Die unterschiedlichen Streuungen ergeben sich wie erwähnt vermutlich daraus, dass das Gewebe bei der zweiten Messung nicht neu befeuchtet wurde. Zu sehen ist, dass sich trotz dieser unterschiedlichen PCA-Diagramme die resultierenden Falschfarbenbilder in nur einem einzelnen Pixel unterscheiden (vgl. Abbildungen 4.20b und 4.20d). Da das Gewebe zwischen den beiden Messungen nicht verändert wurde, zeigen die fast identischen Falschfarbenbilder wie erwähnt die Konstanz der Messbedingungen auch über einen längeren Zeitraum. Ein weiteres Beispiel sind die in Abschnitt 4.2.2 gezeigten Ergebnisse der vier verschiedenen Lagen, die trotz unterschiedlicher Streuungen der jeweiligen PCA-Diagramme untereinander vergleichbar sind.

Dies zeigt die Robustheit des vorgestellten Messverfahrens. In Bezug auf den späteren Einsatz im Operationssaal ist dies relevant, da im Praxiseinsatz vermutlich ebenfalls nicht immer gleiche Wasserschichtdicken und Messbedingungen zu gewährleisten sind.

²⁶Diese sind in Abbildung 4.27 hervorgehoben.

4.2.8 Verwendete spektrale Marker

Wie in den letzten Abschnitt gezeigt, wurden je nach Tumorart unterschiedliche Wellenzahlen als Grundlage für die Gewebeunterscheidungen verwendet. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erläutert, scheint dieses Vorgehen legitim, da auch im Goldstandard je nach Gewebeart mit unterschiedlichen Färbemitteln gearbeitet wird und auch im Stand der Forschung je nach Gewebeart unterschiedliche Wellenzahlen für die Auswertungen verwendet werden. Der Grund dafür sind biochemische Unterschiede zwischen den Gewebearten (s. Abschnitt 1.4.4), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht wurden.

Bei den für die Auswertung verwendeten Wellenzahlen 1550 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} und 1045 cm^{-1} handelt es sich um solche, die auch bei den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Publikationen für die Auswertung verwendet wurden. Bei diesen Publikationen wurden, wie in den Abschnitten 1.4.2 und 1.4.3 beschrieben, zur Gewebedifferenzierung u. a. veränderte Proteinanteile bei 1550 cm^{-1} beobachtet, veränderte Nukleinsäure- und Lipidanteile bei den Wellenzahlen 1240 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} sowie veränderte Kohlenhydratanteile bei 1045 cm^{-1} . Gründe für diese Veränderungen, wie beispielsweise ein erhöhter Nukleinsäureanteil durch höhere Tumorzellteilungsgeschwindigkeit oder ein reduzierter Lipidgehalt aufgrund des erhöhten Tumorstoffwechsels, wurden in Abschnitt 1.4.4 beschrieben.

Da in der vorliegenden Arbeit frisches, ungetrocknetes Gewebe verwendet wurde, können spektrale Unterschiede theoretisch auch in unterschiedlichen Wassergehalten begründet liegen, z.B. indem sich durch unterschiedliche Wasseraufnahme bestimmte Molekülschwingungsformen je nach Gewebe unterschiedlich verändern. Ein solcher Mechanismus wäre aber nicht zwingend als Störgröße zu sehen, sondern als weitere Gewebeeigenschaft, die zur Gewebedifferenzierung verwendet werden kann.

4.2.9 Richtige und falsche Klassifikation

Die in den letzten Abschnitten gezeigten hyperspektralen Bilder zeigen eine hohe Übereinstimmung im Vergleich mit dem jeweiligen Goldstandard. Aufgrund der erwähnten Problematik des flexiblen Gewebes und der damit verbundenen Formveränderung zwischen Messung und Histopathologie ist es schwierig, genaue Aussagen über die korrekte Klassifikation in den Übergangsbereichen zu treffen. Es werden daher solche Pixel als falsch klassifiziert betrachtet, die sich vollständig im Bereich der jeweils anderen Klasse befinden, ohne dass dies im Goldstandard bestätigt wird.

Nach diesem Kriterium betragen Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität zwischen 91 % und 100 %, wie Tabelle 4.3 zeigt. Da Pixel in den Übergangsbereichen zwischen Tumor- und Nor-

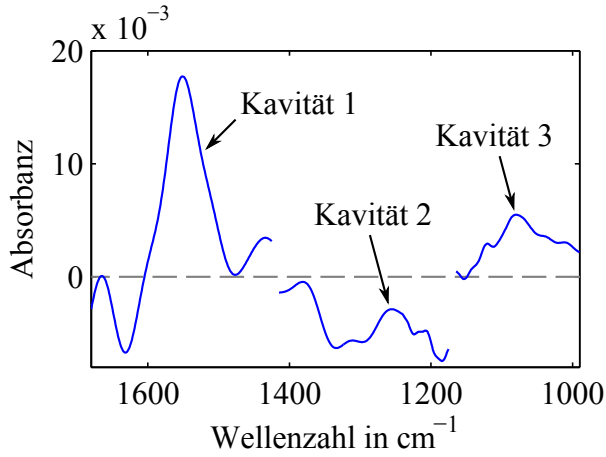
Tabelle 4.3: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessene maximale und minimale Richtigkeiten, Sensitivitäten und Spezifitäten. *Richtigkeit*: Verhältnis von richtig klassifizierten Pixeln zur gesamten Anzahl von Pixeln, s. Gleichung (4.14). *Sensitivität*: Verhältnis von richtig klassifizierten Tumorpixeln zur tatsächlichen Anzahl von Tumorpixeln, s. Gleichung (4.15). *Spezifität*: Verhältnis von richtig klassifizierten Pixeln gesunden Gewebes zur tatsächlichen Anzahl von Pixeln gesunden Gewebes, s. Gleichung (4.16).

Richtigkeit	Maximum	100 %
	Beispiel	0 von 64 falsch klassifizierte Pixel (Abbildung 4.20b)
	Minimum	92 %
	Beispiel	5 von 64 falsch klassifizierte Pixel (Abbildung 4.22b)
Sensitivität	Maximum	100 %
	Beispiel	0 von 20 nicht erkannte Tumorpixel (Abbildung 4.20b)
	Minimum	94 %
	Beispiel	2 von 32 nicht erkannte Tumorpixel (Abbildung 4.17b)
Spezifität	Maximum	100 %
	Beispiel	0 von 44 nicht erkannte gesunde Pixel (Abbildung 4.20b)
	Minimum	91 %
	Beispiel	4 von 45 nicht erkannte gesunde Pixel (Abbildung 4.22b)

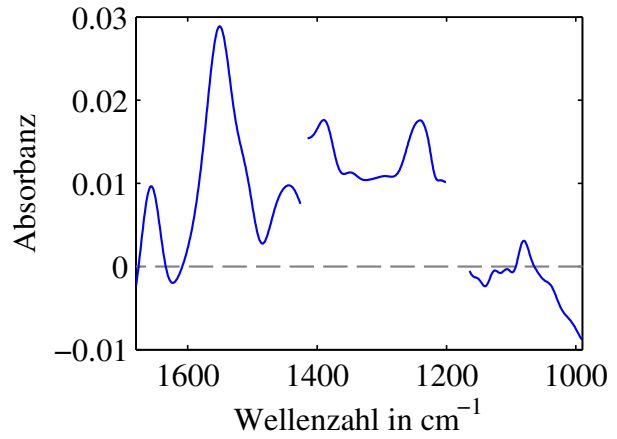
malgewebe nicht in diesen Aussagen enthalten sind, können die tatsächlichen Werte niedriger liegen, jedoch auf der andere Seite auch höher; beispielsweise beziehen sich die niedrigsten hier angegebenen Werte für Richtigkeit und Spezifität auf das Nierengewebe mit unklarer Infiltrationsgrenze (Abbildung 4.22b). Wie im Folgenden erklärt wird, ist bei Verwendung strahlstabilerer Laser in Zukunft zudem eine noch geringere Anzahl an Falschklassifikationen zu erwarten.

Der häufigste Grund für eine falsche Klassifikation im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist, dass die Spektren hinsichtlich der untersuchten Merkmale und nach den Klassifikationskriterien tatsächlich den Spektren der Klasse entsprechen, in die sie fälschlicherweise eingeordnet wurden. Sie zeigen sonst keine wie die im Folgenden beschriebenen Auffälligkeiten. Diese falsch klassifizierten Pixel sind in den Streudiagrammen der Hauptkomponentenanalysen i. d. R. nicht als Ausreißer erkennbar, sondern befinden sich in der Punktwolke mit den meisten anderen Werten. Beispiele dafür sind die falsch klassifizierten Pixel in den Abbildungen 4.17b, 4.18b oder 4.22b. Gründe für diese Art der falschen Klassifikationen sind vermutlich die im Simulationsabschnitt 4.1 untersuchten Störgrößen der Wasserschichtdickenvariation und des Absorbanzrauschens.

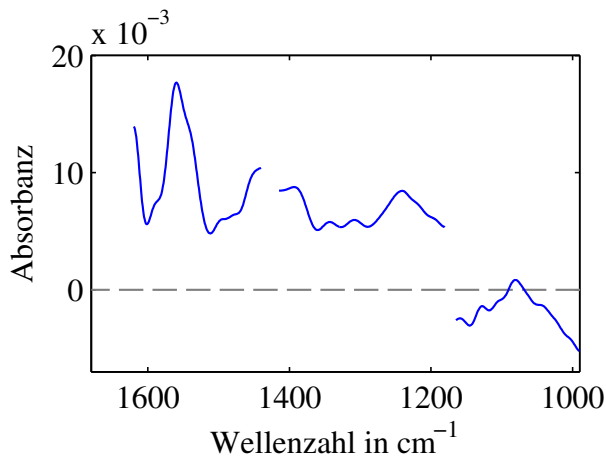
Ein seltenerer Grund für falsche Klassifikation existiert bei bestimmten Pixeln, die i. d. R. in den jeweiligen Streudiagrammen der Hauptkomponentenanalyse als Ausreißer zu erkennen sind. Beispiele dafür sind das in Abbildung 4.17d falsch klassifizierte blaue Pixel, das in Abbildung 4.17c bei den ungefähren Koordinaten $(PC1|PC2) = (0,019| - 0,001)$ als blaues Kreuz



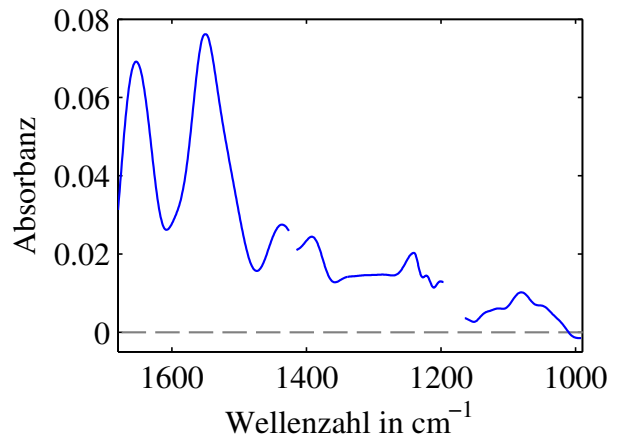
(a) Bsp. 1 für Unstetigkeiten der Absorbanz



(b) Bsp. 2 für Unstetigkeiten der Absorbanz



(c) Bsp. 3 für Unstetigkeiten der Absorbanz



(d) Bsp. 4 für Unstetigkeiten der Absorbanz

Abbildung 4.28: (a) bis (d) zeigen beispielhaft Spektren, deren Unstetigkeiten an den Kavitätsübergängen zu Ausreißern in den Streudiagrammen der Hauptkomponentenanalysen und damit zu falschen Klassifikationen führen. Ein möglicher Grund für die Unstetigkeiten sind gelegentlich auftretende, kavitätsabhängige starke Strahlageschwankungen, z.B. aufgrund von Temperaturveränderungen im Laser. Probenabhängige Einflüsse sind unwahrscheinlich, u. a. aufgrund der Unstetigkeiten an den Kavitätsrändern sowie aufgrund der variierenden Richtungen der Absorbanzsprünge. Das in (c) gezeigte Spektrum beginnt erst bei ungefähr 1630 cm^{-1} , da die Startwellenzahl des Lasers von Messung zu Messung variiert.

markiert ist, das in Abbildung 4.18d falsch klassifizierte Pixel, das in Abbildung 4.18c bei ca. $(PC1|PC2) = (-0,009 | -0,009)$ als blaues Kreuz markiert ist oder das in Abbildung 4.26d falsch klassifizierte rote Pixel, das in Abbildung 4.26c bei ca. $(PC1|PC2) = (0,038 | -0,009)$ als roter Kreis markiert ist.

Vier Spektren solcher Fälle sind in Abbildung 4.28 gezeigt. Zu erkennen sind starke Unstetigkeiten der Absorbanzen an den jeweiligen Kavitätsübergängen. Eine Veränderung der Probe, z.B. durch Trocknung, würde nicht zu diesen spektralen Unstetigkeiten führen, zumal die Richtungen der Sprünge an den Kavitätsrändern nicht einheitlich sind, wie Abbildung 4.28 zeigt; auch tritt das Phänomen räumlich isoliert auf, d.h. umgebende Pixel zeigen diese Kennzeichen nicht. Ein probenverursachter Grund ist daher unwahrscheinlich. Ebenfalls unwahrscheinlich sind Laserintensitätsschwankungen, da diese vom Referenzdetektor gemessen und das Spektrum entsprechend korrigiert werden würde.

Ein wahrscheinlicherer Grund ist daher, dass diese Schwankungen aus kavitätsabhängigen Strahllagen des Lasers resultieren, die sich aufgrund der unterschiedlichen Strahlengänge (D1, D2, s. Abbildung 3.8) unterschiedlich stark auf die beiden Messkanäle auswirken. Die Strahllagestabilität wird vom Hersteller mit $< 2 \text{ mrad}$ für einen Durchstimmbereich von 100 cm^{-1} angegeben (s. Abschnitt 3.6.1). Für einen Strahl, der unter einem Winkel $\vartheta = 2 \text{ mrad}$ auf die im Rahmen der Arbeit verwendeten Linsen mit Fokusslänge $f = 25 \text{ mm}$ (s. Abschnitt 3.6.1) trifft, ergibt sich der grob abgeschätzte räumliche Versatz Δy in der Detektorebene wie folgt [HMS04, S. 429]:

$$\Delta y = f \cdot \tan \vartheta = 25 \text{ mm} \cdot \tan (2 \text{ mrad}) = 0,05 \text{ mm} \quad (4.17)$$

Für die auf die Detektorfläche von 1 mm (s. Abschnitt 3.6.1) treffende Strahlung wird in der Detektorebene ein Strahldurchmesser von etwas unter 1 mm angenommen. Der in Gleichung (4.17) berechnete Wert kann daher zu leichten Intensitätsschwankungen führen, wenn je nach Strahl-lage die Strahlung nicht vollständig auf den Detektor gelangt. Aufgrund der unterschiedlichen Strahlengänge von Proben- und Referenzdetektor ist zu erwarten, dass dieser Effekt bei einem der beiden Detektoren stärker auftritt als bei dem anderen. Es kann somit beispielsweise ein probenunabhängiger Intensitätsabfall am Probendetektor auftreten, der vom Referenzdetektor nicht in dem tatsächlichen Maße detektiert wird. Ist die Strahl-lage zeitlich veränderlich, so entstehen dadurch probenunabhängige Unterschiede zwischen Proben- und Hintergrundspektrum, die sich in den Absorbanzspektren entsprechend äußern. Dieser Mechanismus ist einer der möglichen Gründe für die in Abbildung 3.21a gezeigten Oszillationen, die durch die Referenzmessung nicht vollständig eliminiert werden.

Darüber hinaus lässt das in Abbildung 4.28 gezeigte Phänomen jedoch darauf schließen, dass der vom Hersteller genannte Wert der Strahllagestabilität von $< 2 \text{ mrad}$ in bestimmten Fällen überschritten wird und dass dadurch die in Abbildung 4.28 gezeigten extremen, kavitätsabhängigen Schwankungen zustande kommen. Diese Erklärung ist wahrscheinlich, da die drei Kavitäten

im Laser an unterschiedlichen Positionen angeordnet sind. Durch ein mechanisches Spiegelsystem werden während eines spektralen Scans die Strahlen der einzelnen Kavitäten nacheinander auf demselben optischen Weg emittiert (s. Abschnitt 3.6.1). Die in Abbildung 4.28 gezeigten Unstetigkeiten an den Kavitätsübergängen könnten daher rühren, dass das Spiegelsystem in bestimmten Fällen so ungenau arbeitet, dass die Strahllagen nicht der im Rahmen der Arbeit geforderten Genauigkeit entsprechen. Ein möglicher Grund dafür sind z.B. Temperaturveränderungen im Lasersystem aufgrund einer nicht ausreichenden Temperaturregelung und einer damit verbundenen mangelnden Positionswiederholgenauigkeit der Spiegel. Auch zeigen die Abbildungen 4.28a und 4.28b eine starke Intensitätsveränderung im Bereich der ersten Kavität; Grund dafür kann theoretisch eine Temperaturveränderung des Spiegelsystems in diesem Zeitraum sein. Gleiches gilt z.B. für den starken Abfall der dritten Kavität in Abbildung 4.28b. Bei dieser Erklärung für die Ursachen der in Abbildung 4.28 gezeigten Spektren handelt es sich jedoch nur um eine Vermutung, die aufgrund des vergleichsweise seltenen Auftretens des Phänomens nicht verifiziert wurde, zumal es sich wohl um ein laserinternes Problem handelt.

Durch das in Abbildung 4.28 gezeigte Phänomen der Absorbanzsprünge wird die Gewebedifferenzierung erheblich erschwert, da für die Differenzierung Wellenzahlen aus den unterschiedlichen Spektralbereichen der Kavitäten zueinander in Verhältnis gebracht werden. Die Folge davon sind die genannten Ausreißer, die zu falscher Klassifikation der dazugehörigen Pixel führen können.

Das Phänomen tritt jedoch in der in Abbildung 4.28 gezeigten intensiven Form relativ selten auf. Kleinere durch das Phänomen verursachte Absorbanzschwankungen sind, wie erwähnt, vermutlich Teil des in Abbildung 3.21 gezeigten und im Simulationsabschnitt berücksichtigten Rauschens. Die hier gezeigte intensive Form wird im Rahmen der Arbeit daher nicht als regelmäßig auftretende Störgröße betrachtet, sondern als gelegentlich auftretende Ausreißer. Beispielsweise tritt die Problematik bei manchen Messungen gehäuft auf, bei anderen Messungen überhaupt nicht. Die Störgröße wurde daher im Rahmen der Simulation nicht betrachtet. Es ist zudem von besseren Strahllagestabilitäten bei zukünftigen QCL-Systemen auszugehen sowie von einer damit verbundenen noch geringeren Anzahl von Falschklassifikationen.

5 Diskussion und Ausblick

Wie in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, wurden bisherige Forschungsarbeiten im Bereich bildgebender Tumorerkennung durch MIR-Spektroskopie ausschließlich an getrocknetem Gewebe durchgeführt. Der Grund dafür sind v. a. zahlreiche kritische Stimmen, die eine bildgebende Differenzierung von frischem, ungetrocknetem Tumorgewebe für unvereinbar halten mit der Verwendung von Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich (z.B. [DKI⁺08]).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass mit dem entwickelten Quantenkaskadenlaser-Spektrometer die hyperspektrale, bildgebende Differenzierung frischer und ungetrockneter, d.h. nativer, Tumorproben möglich ist. Bei [LHL⁺02, SGS⁺09, BMR⁺12] werden je nach Art der Untersuchung Richtigkeiten, Sensitivitäten und Spezifitäten zwischen ca. 90 % und 100 % für FTIR-Messungen an getrocknetem Tumorgewebe genannt; vergleichbare Werte wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei den in Abschnitt 4.2 gezeigten Messungen von nativem Gewebe erreicht (s. Tabelle 4.3).

Durch das im Rahmen der Arbeit entwickelte Verfahren wurde somit die Basis für die bildgebende intraoperative Gewebedifferenzierung und gleichzeitig ein Ausgangspunkt für die prototypische Entwicklung geschaffen.

Darüber hinaus wird das weitreichende Entwicklungspotential der entwickelten Methode deutlich, wenn man die limitierenden Faktoren des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Verfahrens betrachtet:

- Das verwendete QCL-System aus dem Jahr 2013 kann aufgrund bestimmter Eigenschaften wie z.B. Gewicht, Größe oder Durchstimmgeschwindigkeit (s. z.B. Abschnitt 3.6.1) noch nicht für einen intraoperativen Einsatz verwendet werden.
- Bestimmte Eigenschaften dieser ersten Generation breit durchstimmbarer QCL-Systeme, wie z.B. Strahlageinstabilitäten oder Intensitätsschwankungen, verhindern eine noch geringere Falschklassifikation (s. Abschnitt 4.2.9).
- Die implementierte Hauptkomponentenanalyse ermöglicht noch kein vollständig automatisches Setzen von Schwellwerten für die Erstellung von Falschfarbenbildern.

Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich diese Einschränkungen in Zukunft mittels folgender Aspekte überwinden lassen:

- Verwendung eines ausgereifteren QCL-Systems als Teil eines tragbaren Geräts. Im Vergleich zu dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten breit durchstimmbaren QCL-System der ersten Generation zeigt die zweite, etwa seit dem Jahr 2014 erhältliche Generation bereits erhebliche Verbesserungen¹.

Eine alternative Möglichkeit ist die parallelisierte Aufnahme weniger, für die Auswertung relevanter Wellenzahlen durch Verwendung mehrerer diskret emittierender Quantenkaskadenlaser. Es wäre dadurch kein zeitintensives Durchstimmen des gesamten Spektralbereichs notwendig und es könnte z.B. zusätzlich ein Laser eingesetzt werden, der in Bereichen emittiert, die für Wasserkorrekturalgorithmen relevant sind [PWJ86, DTP89, RH97].

- Fortgeschrittene Datenanalyse wie z.B. „künstliche neuronale Netze“ [LHL⁺02, BMR⁺12] würden in Verbindung mit mehr Messdaten für die einzelnen Gewebearten eine automatisierte Klassifizierung von Pixeln ermöglichen.

Es sei darüber hinaus an dieser Stelle auch noch einmal betont, dass mit dem Gerät nicht *diagnostiziert*, sondern Gewebe *differenziert* wird. Es wäre in diesem Zusammenhang auch denkbar vor einem operativen Eingriff per Biopsie Proben zu entnehmen, diese histopathologisch zu bewerten und die entsprechenden Gewebespektren individuell als Unterscheidungskriterien zu verwenden. Genauso könnten während der Operation anhand eindeutig tumoröser und eindeutig gesunder Bereiche automatisch Klassifikationskriterien erstellt werden, um dann Übergangsbereichen richtig zu beurteilen.

- Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Verwendung von ATR-Mehrfachreflexionskristallen: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine ATR-Kristallgeometrie entwickelt und beim Deutschen Patent- und Markenamt angemeldet, die Mehrfachreflexion und gleichzeitig Bildgebung ermöglicht (s. Abschnitt 4.1.6) [GKS14]. Die Realisierung dieses Konzepts würde aufgrund einer höheren Absorption das Signal-Rausch-Verhältnis im Absorbanzraum erhöhen. Da das Absorbanzrauschen im Simulationsteil 4.1.5 als limitierend für die Gewebeunterscheidung identifiziert wurde, würde eine solche bildgebende Mehrfachreflexionseinheit die Anzahl falsch klassifizierter Pixel vermutlich reduzieren.

Somit kann eine Weiterentwicklung bzw. ein intraoperativ und in vivo einsetzbarer Prototyp entstehen, der dem Chirurgen bei der Identifizierung der Resektionsgrenzen assistiert; eine solche Anwendung ist beispielhaft in Abbildung 5.1 skizziert.

¹Das System wiegt nur noch 2kg (statt zuvor 20kg) bei einem Volumen von 2,6l (statt zuvor 18l), es sind höhere spektrale Bandbreiten möglich, ein vollständiger spektraler Scan dauert nur noch mehrere zehn Millisekunden statt mehrere zehn Sekunden und die Wellenzahlen können der emittierten Strahlung direkt zugeordnet werden [YKLB15, Blo14]

Im Vergleich zu den im Stand der Technik beschriebenen, teilweise intraoperativ eingesetzten klassischen Bildgebungsverfahren wie CT, MRT oder Sonographie (Abschnitt 1.3.2) wäre die Anwendung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Verfahrens vermutlich kostengünstiger (CT, MRT), weniger strahlenbelastend (CT) und höher auflösend (Sonographie). Für die Methode wären zudem keine Fluoreszenzmarker notwendig und es wäre, anders als z.B. *5-ALA*, für eine Vielzahl von Tumoren einsetzbar.

Im Vergleich zu dem in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen Schnellschnittverfahren würde ein solches Gerät Tumorgewebe unmittelbar vor der Resektion identifizieren. Ermöglicht würde so die vollständige Entfernung von Tumorbereichen bei gleichzeitiger Minimierung der Sicherheitsabstände im gesunden Gewebe; dies würde zu maximal schonenden Eingriffen führen. Es könnten dadurch die Zahl der Rückfälle (Rezidive) gesenkt, die Rehabilitationszeit verkürzt und die Kosten des Krankheitsverlaufs reduziert werden.

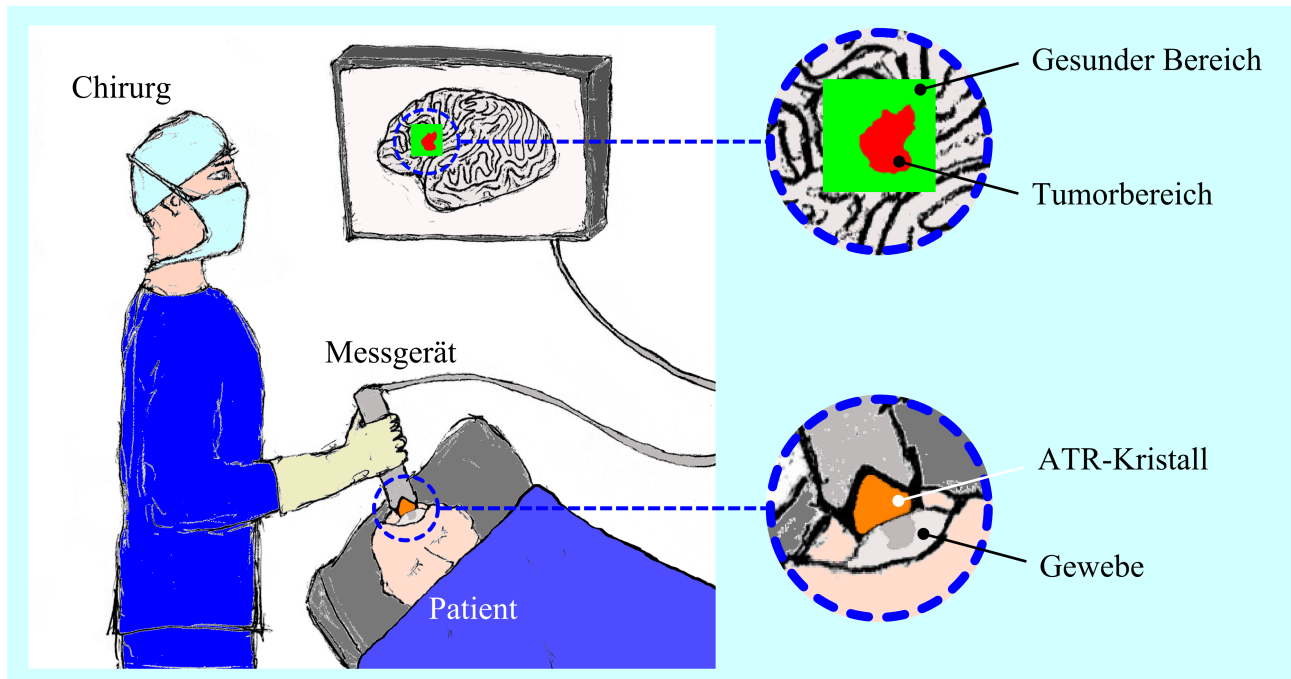


Abbildung 5.1: Darstellung einer möglichen Realisierung des im Rahmen der Arbeit entwickelten Konzepts. Durch das Verfahren werden dem Chirurgen gesunde und tumoröse Bereiche angezeigt. Aus Biokompatibilitätsgründen könnte für den ATR-Kristall Diamant verwendet werden, das den gleichen Brechungsindex wie das im Rahmen der Arbeit verwendete Zinkselenid aufweist. Durch z.B. gekrümmte Kristalloberflächen könnten auch unebene Gewebestrukturen gemessen werden. Zudem wäre durch aufwändigere Strahlformung aufgrund der Laserstrahllichtquelle auch eine höhere als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Auflösung von 1 mm möglich. Dies wäre beispielsweise in Bezug auf Mikrochirurgie im Hirn von Bedeutung. Durch Verwendung optischer Fasern könnte das entwickelte Konzept auch in Form eines Endoskops für die minimal-invasive Tumorchirurgie eingesetzt werden. Es wäre langfristig zudem die Fusion der spektralen Messergebnisse mit dreidimensionalen Oberflächendaten des Gewebes denkbar, um auch verdeckte Tumorbereiche darstellen zu können. Auch könnten Messergebnisse im Rahmen eines „Augmented Reality“-Konzepts auf das Gewebe rückprojiziert werden, um assistierend Schnittkanten zwischen gesundem und tumorösem Gewebe *in situ* zu zeigen.

Literaturverzeichnis

- [ABD⁺06] AMHARREF, N. ; BELJEBBAR, A. ; DUKIC, S. ; VENTEO, L. ; SCHNEIDER, L. ; PLUOT, M. ; VISTELLE, R. ; MANFAIT, M.: Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006), Nr. 7, S. 892–899
- [ABD⁺07] AMHARREF, N. ; BELJEBBAR, A. ; DUKIC, S. ; VENTEO, L. ; SCHNEIDER, L. ; PLUOT, M. ; ; MANFAIT, M.: Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007), Nr. 10, S. 2605–2615
- [ABD⁺09] A., Beljebbar ; BOUCHÉ, O. ; DIÉBOLD, M.D. ; GUILLOU, P.J. ; PALOT, J.P. ; EUDES, D. ; MANFAIT, M.: Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 72 (2009), S. 255–264
- [Abu11] *Kapitel* Synchrotron Radiation: Applications in Diagnosis and Treatment of Malignant Brain Tumors (Ali, S.K.; Das, U.; Lu, Y.; Kundapur, V. und May, T.). In: ABUJAMRA, A.L. (Hrsg.): *Diagnostic Techniques and Surgical Management of Brain Tumors*. InTech, Rijeka, 2011. – ISBN 978–953–307–589–1
- [ALC⁺08] ALI, K. ; LU, Y. ; CHRISTENSEN, C. ; MAY, T. ; HYETT, C. ; GRIEBEL, R. ; FOURNEY, D. ; MEGURO, K. ; RESCH, L. ; SHARMA, R.K.: Fourier transform infrared spectromicroscopy and hierarchical cluster analysis of human meningiomas. In: *International Journal of Molecular Medicine* 21 (2008), Nr. 3, S. 297–301
- [BAL⁺08] BELJEBBAR, A. ; AMHARREF, N. ; LEVEQUES, A. ; DUKIC, S. ; VENTEO, L. ; SCHNEIDER, L. ; PLUOT, M. ; MANFAIT, M.: Modeling and quantifying biochemical changes in C6 tumor gliomas by Fourier transform infrared imaging. In: *Analytical Chemistry* 80 (2008), Nr. 22, S. 8406–8415
- [BAMH08] BOGOMOLNY, E. ; ARGOV, S. ; MORDECHAI, S. ; HULEIHEL, M.: Monitoring of viral cancer progression using FTIR microscopy: A comparative study of intact cells and tissues. In: *BBA - General Subjects* 1780 (2008), Nr. 9, S. 1038–1046

- [Ban83] BANWELL, C.N.: *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. 3. McGraw-Hill, 1983. – ISBN 0-07-084139-X
- [Bas95] *Kapitel Photodetectors* (Norton, P.R.). In: BASS, M. (Hrsg.): *Handbook of Optics: Fundamentals, Techniques, and Design, Volume I*. 2. McGraw-Hill, 1995. – ISBN 0-07-047740-X
- [Bas09] *Kapitel Infrared Detector Arrays* (Kozlowski, L.J. und Kosonocky, W.F.). In: BASS, M. (Hrsg.): *Handbook of Optics, Third Edition Volume II: Design, Fabrication and Testing, Sources and Detectors, Radiometry and Photometry*. 3. McGraw-Hill, 2009. – ISBN 978-0-07-149890-6
- [BB04] BIGIO, I.J. ; BOWN, S.G.: Spectroscopic sensing of cancer and cancer therapy: current status of translational research. In: *Cancer biology & therapy* 3 (2004), Nr. 3, S. 259–267
- [BBB⁺09] BASSAN, P. ; BYRNE, H.J. ; BONNIER, F. ; LEE, J. ; DUMASC, P. ; GARDNER, P.: Resonant Mie scattering in infrared spectroscopy of biological materials – understanding the dispersion artefact. In: *Analytist* 134 (2009), Nr. 8, S. 1586–1593
- [BBL⁺09] BIRD, B. ; BEDROSSIAN, K. ; LAVER, N. ; MILJKOVIC, M. ; ROMEO, M.J. ; DIEM, M.: Detection of breast micro-metastases in axillary lymph nodes by infrared micro-spectral imaging. In: *Analytist* 134 (2009), Nr. 6, S. 1067–1076
- [BDAM10] BELJEBBAR, A. ; DUKIC, S. ; AMHARREF, N. ; MANFAIT, M.: Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe. In: *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 298 (2010), Nr. 1, S. 477–487
- [BDD⁺10] BENARD, A. ; DESMEDT, C. ; DURBECQ, V. ; ROUAS, G. ; LARSIMONT, D. ; SOTIRIOU, C. ; GOORMAGHTIGH, E.: Discrimination between healthy and tumor tissues on formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples using IR imaging. In: *Spectroscopy* 24 (2010), Nr. 1–2, S. 67–72
- [BDHM08a] *Kapitel Tumorerkrankungen* (Böcker, W.; Höfler, H.K.; Lax, S.; Poremba, C.; Moll, R.; Tannapfel, A. und Probst-Hensch, N.). In: BÖCKER, W. (Hrsg.) ; DENK, H. (Hrsg.) ; HEITZ, Ph.U. (Hrsg.) ; MOCH, H. (Hrsg.): *Pathologie*. Elsevier Urban & Fischer, München, 2008. – ISBN 978-3-437-42382-6
- [BDHM08b] *Kapitel Zell- und Gewebereaktionen* (Zatloukal, K.; Roth, J. und Denk, H.). In: BÖCKER, W. (Hrsg.) ; DENK, H. (Hrsg.) ; HEITZ, Ph.U. (Hrsg.) ; MOCH,

- H. (Hrsg.): *Pathologie*. Elsevier Urban & Fischer, München, 2008. – ISBN 978-3-437-42382-6
- [BDHM08c] *Kapitel Pathologie: Aufgaben und Methoden* (Moch, H.; Komminoth, P.; Zimmermann, D.R.; Odermatt, B.; Probst-Hensch, N. und Bopp, M.). In: BÖCKER, W. (Hrsg.) ; DENK, H. (Hrsg.) ; HEITZ, Ph.U. (Hrsg.) ; MOCH, H. (Hrsg.): *Pathologie*. Elsevier Urban & Fischer, München, 2008. – ISBN 978-3-437-42382-6
- [Ber95] BERNATH, P.F.: *Spectra of atoms and molecules*. 1. Oxford University Press, 1995. – ISBN 0-19-507598-6
- [Ber03] BERGH, H.v.d.: Early Detection of Lung Cancer and the Role of Endoscopic Fluorescence Imaging. In: *Medical Laser Application* 18 (2003), Nr. 1, S. 20–26
- [BGB⁺08] BAKER, M.J. ; GAZI, E. ; BROWN, M.D. ; SHANKS, J.H. ; GARDNER, P. ; CLARKE, N.W.: FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. In: *British Journal of Cancer* 99 (2008), Nr. 11, S. 1859–1866
- [BGM⁺03] BINDIG, U. ; GERSONDE, I. ; MEINKE, M. ; BECKER, Y. ; MÜLLER, G.: Fibre-optic IR-spectroscopy for biomedical diagnostics. In: *Spectroscopy: An International Journal* 17 (2003), Nr. 2/3, S. 323–344
- [BGV07] *Unfallverhütungsvorschrift Laserstrahlung BGV B2*. Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd, Juni 2007
- [Bha07] BHARGAVA, R.: Towards a practical Fourier transform infrared chemical imaging protocol for cancer histopathology. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007), Nr. 4, S. 1155–1169
- [BL12] BRANDSTETTER, M. ; LENDL, B.: Tunable mid-infrared lasers in physical chemosensors towards the detection of physiologically relevant parameters in biofluids. In: *Sensors and Actuators B* 170 (2012), S. 189–195
- [Blo14] *Datenblatt Lasertune*. Block Engineering, Marlborough, USA, 2014
- [BMD10] BIRD, B. ; MILJKOVIC, M. ; DIEM, M.: Two step resonant Mie scattering correction of infrared micro-spectral data: human lymph node tissue. In: *Journal of Biophotonics* 3 (2010), Nr. 8–9, S. 597–608

- [BMR⁺12] BIRD, B. ; MILJKOVIC, M.S. ; REMISZEWSKI, S. ; AKALIN, A. ; KON, M. ; DIEM, M.: Infrared spectral histopathology (SHP): a novel diagnostic tool for the accurate classification of lung cancer. In: *Laboratory Investigation* 92 (2012), Nr. 9, S. 1358–1373
- [Boy83] BOYD, R.W. ; BALLARD, S.S. (Hrsg.): *Radiometry and the Detection of Optical Radiation*. 1. John Wiley & Sons New York Chichester, 1983 (Pure and Applied Optics). – ISBN 0–471–86188–X
- [Bru06] *Vertex 80v Benutzerhandbuch, 1. Auflage*. Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D., 2006
- [BSG⁺13] BRANDSTETTER, M. ; SUMALOWITSCH, T. ; GENNER, A. ; POSCH, A.E. ; HERWIG, C. ; DROLZ, A. ; FUHRMANN, V. ; PERKMANN, T. ; LENDL, B.: Reagent-free monitoring of multiple clinically relevant parameters in human blood plasma using a mid-infrared quantum cascade laser based sensor system. In: *Analyst* 138 (2013), Nr. 14, S. 4022–4028
- [BSK⁺12] BASSAN, P. ; SACHDEVA, A. ; KOHLER, A. ; HUGHES, C. ; HENDERSON, A. ; BOYLE, J. ; SHANKS, J.H. ; BROWN, M. ; CLARKE, N.W. ; GARDNER, P.: FTIR microscopy of biological cells and tissue: data analysis using resonant Mie scattering (RMieS) EMSC algorithm. In: *Analyst* 137 (2012), S. 1370–1377
- [BSLG13] BASSAN, P. ; SACHDEVA, A. ; LEE, J. ; GARDNER, P.: Substrate contributions in micro-ATR of thin samples: implications for analysis of cells, tissue and biological fluids. In: *Analyst* 138 (2013), Nr. 14, S. 4139–4146
- [BSMM06] BRONSTEIN, I.N. ; SEMENDJAJEW, K.A. ; MUSIOL, G. ; MÜHLIG, H.: *Taschenbuch der Mathematik*. 6. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 2006. – ISBN 3–8171–2006–0
- [BSPF⁺07] BROEK, N. van d. ; SANGEN, M.J. van d. ; POL-FRANSE, L.V. van d. ; BEEK, M.W. v. ; NIEUWENHUIJZEN, G.A. ; VOOGD, A.C.: Margin status and the risk of local recurrence after breast-conserving treatment of lobular breast cancer. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 105 (2007), Nr. 1, S. 63–68
- [BSS⁺05] BELEITES, C. ; STEINER, G. ; SOWA, M.G. ; BAUMGARTNER, R. ; SOBOTTKA, S. ; SCHACKERT, G. ; SALZER, R.: Classification of human gliomas by infrared imaging spectroscopy and chemometric image processing. In: *Vibrational Spectroscopy* 38 (2005), Nr. 1–2, S. 143–149

- [BT13] *Kapitel Tunable mid-infrared laser absorption spectroscopy* (Tittel, F.K. und Lewicki, R.). In: BARANOV, A. (Hrsg.) ; TOURNIE, E. (Hrsg.): *Semiconductor Lasers. Fundamentals and Applications*. Woodhead Publishing, 2013. – ISBN 978-0-85709-121-5
- [BWRG14] BASSAN, P. ; WEIDA, M.J. ; ROWLETTE, J. ; GARDNER, P.: Large scale infrared imaging of tissue micro arrays (TMAs) using a tunable Quantum Cascade Laser (QCL) based microscope. In: *Analyst* 139 (2014), Nr. 16, S. 3856–3859
- [BWZM02] BINDIG, U. ; WÄSCHE, W. ; ZELIANOS, K. ; MÜLLER, G.: Fiber-optical and microscopic detection of malignant tissue by use of infrared spectrometry. In: *J. of Biomedical Optics* 7 (2002), Nr. 1, S. 100–108
- [BZL⁺11] BERGHOLT, M.S. ; ZHENG, W. ; LIN, K. ; HO, K.Y. ; TEH, M. ; YEOH, K.G. ; SO, J.B.Y. ; HUANG, Z.: Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 10, S. 4104–4110
- [Car07] CARUS, T.: *Operationsatlas Laparoskopische Chirurgie*. 1. Springer Verlag Heidelberg, 2007. – ISBN 978-3-540-33673-0
- [CCG⁺10] CURL, R.F. ; CAPASSO, F. ; GMACHL, C. ; KOSTEREV, A.A. ; MCMANUS, B. ; LEWICKI, R. ; PUSHARSKY, M. ; WYSOCKI, G. ; TITTEL, F.K.: Quantum cascade lasers in chemical physics. In: *Chemical Physics Letters* 487 (2010), Nr. 1–3, S. 1–8
- [CCK11] COLAGAR, A. ; CHAICHI, M. ; KHADJVAND, T.: Fourier transform infrared microspectroscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue. In: *Journal of Biosciences* 36 (2011), Nr. 4, S. 669–677
- [Cha05] CHARLTON, C.: *Quantum Cascade Lasers for Mid-Infrared Chemical Sensing*, Georgia Institute of Technology, Diss., 2005
- [CHW⁺03] CHANG, J.-I. ; HUANG, Y.-B. ; WU, P.-C. ; CHEN, C.-C. ; HUANG, S.-C. ; TSAIB, Y.-H.: Characterization of human cervical precancerous tissue through the Fourier transform infrared microscopy with mapping method. In: *Gynecologic Oncology* 91 (2003), Nr. 3, S. 577–583
- [CKL⁺98] COLARUSSO, P. ; KIDDER, L.H. ; LEVIN, I.W. ; FRASER, J.C. ; ARENS, J.F. ; LEWIS, E.N.: Infrared Spectroscopic Imaging: From Planetary to Cellular Systems. In: *Applied Spectroscopy* 52 (1998), Nr. 3, S. 106A–120A

- [CMH⁺04] CHAGPAR, A.B. ; MARTIN, R.C. ; HAGENDOORN, L.J. ; CHAO, C. ; MCMASTERS, K.M.: Lumpectomy margins are affected by tumor size and histologic subtype but not by biopsy technique. In: *The American Journal of Surgery* 188 (2004), Nr. 4, S. 399–402
- [Com14] *Fresnel Equations, Application ID: 14713*. Comsol Multiphysics GmbH, Göttingen, D., 2014. – <https://www.comsol.de/model/fresnel-equations-14713>
- [DAJ01] DAVIS, S.P. ; ABRAMS, M.C. ; J.W., Brault: *Fourier Transform Spectrometry*. 5. Elsevier Inc., 2001. – ISBN 978-0-08-050691-3
- [Day12] *Datenblatt Pulsed Übertuner Lasers*. Daylight Solutions, San Diego, USA, 2012
- [Day13a] *User Manual MIRcat Tunable Mid-IR External Cavity Laser System*. Daylight Solutions, San Diego, USA, 2013
- [Day13b] *Datenblatt MIRcat laser system*. Daylight Solutions, San Diego, USA, 2013
- [DBWR05] DEMOS, S.G. ; BOLD, R. ; WHITE, Rd.V. ; RAMSAMOOJ, R.: Investigation of near-infrared autofluorescence imaging for the detection of breast cancer. In: *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 11 (2005), Nr. 4, S. 791–798
- [Dem11] DEMTRÖDER, W.: *Laserspektroskopie 1. Grundlagen*. 6. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2011. – ISBN 978-3-642-21306-9
- [Dem13] DEMTRÖDER, W.: *Experimentalphysik 2. Elektrizität und Optik*. 6. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2013. – ISBN 978-3-642-29944-5
- [DISD09] DENER, C ; INAN, A. ; SEN, M. ; DEMIRCI, S.: Interoperative frozen section for margin assessment in breast conserving energy. In: *Scandinavian Journal of Surgery* 98 (2009), Nr. 1, S. 34–40
- [DKD05] DIRCKX, J.J.J. ; KUYPERS, L.C. ; DECRAEMER, W.F.: Refractive index of tissue measured with confocal microscopy. In: *Journal of Biomedical Optics* 10 (2005), Nr. 4, S. 044014
- [DKI⁺08] DAS, K. ; KENDALL, C. ; ISABELLE, M. ; FOWLER, C. ; CHRISTIE-BROWN, J. ; STONE, N.: FTIR of touch imprint cytology: a novel tissue diagnostic technique. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 92 (2008), Nr. 3, S. 160–164
- [DML⁺13] DIEM, M. ; MAZUR, A. ; LENAU, K. ; SCHUBERT, J. ; BIRD, B. ; MILJKOVIC, M. ; KRAFFT, C. ; POPP, J.: Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging. In: *Journal of Biophotonics* 6 (2013), Nr. 11–12, S. 855–886

- [DTP89] DOUSSEAU, F. ; THERRIEN, M. ; PEZOLET, M.: On the Spectral Subtraction of Water from the FT-IR Spectra of Aqueous Solutions of Proteins. In: *Applied Spectroscopy* 43 (1989), Nr. 3, S. 538–542
- [Dud05] DUDENREDAKTION: *Das Fremdwörterbuch*. 8. Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, Mannheim, 2005
- [Duf14] DUFFAU, H.: The Conceptual Limitation to Relying on Intraoperative Magnetic Resonance Imaging in Glioma Surgery. In: *World Neurosurgery* 82 (2014), Nr. 5, S. 601–603
- [EFF⁺11] EWELT, C. ; FLOETH, F.W. ; FELSBERG, J. ; STEIGER, H.J. ; SABEL, M. ; LANGEN, K.-J. ; STOFFELS, G. ; STUMMER, W.: Finding the anaplastic focus in diffuse gliomas: The value of Gd-DTPA enhanced MRI, FET-PET, and intraoperative, ALA-derived tissue fluorescence. In: *Clinical Neurology and Neurosurgery* 113 (2011), Nr. 7, S. 541–547
- [EG06] ELLIS, D.I. ; GOODACRE, R.: Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. In: *Analyst* 131 (2006), Nr. 8, S. 875–885
- [EM13] ERBE, A. ; MILOSEVIC, M.: Correspondence Regarding the Article On the Nature of the Evanescent Wave (Appl. Spectrosc. 2013. 67[2]: 126-130). How Total is Total Reflection from Powdered Samples? In: *Applied Spectroscopy* 67 (2013), Nr. 6, S. 699–701
- [EMV10] *EMVA Standard 1288. Standard for Characterization of Image Sensors and Cameras. Release 3.0*. European Machine Vision Association, November 2010
- [Eur06] *Richtlinie 2006/25/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2006 über Mindestvorschriften zum Schutz von Sicherheit und Gesundheit der Arbeitnehmer vor der Gefährdung durch physikalische Einwirkungen (künstliche optische Strahlung)*. Amtsblatt der Europäischen Union, 2006
- [FBHL05] FERNANDEZ, D.C. ; BHARGAVA, R. ; HEWITT, S.M. ; LEVIN, I.W.: Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition. In: *Nature Biotechnology* 23 (2005), Nr. 4, S. 469–474
- [FCS⁺94] FAIST, J. ; CAPASSO, F. ; SIVCO, D.L. ; SIRTORI, C. ; HUTCHINSON, A.L. ; CHO, A.Y.: Quantum Cascade Laser. In: *Science* 22 264 (1994), Nr. 5158, S. 553–556

- [FLBH03] FABIAN, H. ; LASCH, P. ; BOESE, M. ; HAENSCH, W.: Infrared microspectroscopic imaging of benign breast tumor tissue sections. In: *Molecular Structure* 661-662 (2003), S. 411–417
- [FMAK04] FUJIOKA, N. ; MORIMOTO, Y. ; ARAI, T. ; KIKUCHI, M.: Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. In: *Cancer Detection and Prevention* 28 (2004), Nr. 1, S. 32–36
- [FSE⁺11] FLOETH, F.W. ; SABEL, M. ; EWELT, C. ; STUMMER, W. ; FELSBERG, J. ; REIFENBERGER, G. ; STEIGER, H.K. ; STOFFELS, G. ; COENEN, H.H. ; LANGEN, K.-J.: Comparison of 18F-FET PET and 5-ALA fluorescence in cerebral gliomas. In: *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38 (2011), S. 731–741
- [FTE⁺06] FABIAN, H. ; THI, N.A. ; EIDEN, M. ; LASCH, P. ; SCHMITT, J. ; NAUMANN, D.: Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006), Nr. 7, S. 874–882
- [Gan03] GANSER, H.: *Einsatz eines Quantenkaskadenlasers zum hochempfindlichen Spurengasnachweis mittels IR-Laserspektroskopie*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diss., 2003
- [GDP⁺03] GAZI, E. ; DWYER, J. ; P., Gardner ; GHANBARI-SIAHKALI, A. ; WADE, A.P. ; MIYAN, J. ; LOCKYER, N.P. ; VICKERMAN, J.C. ; CLARKE, N.W. ; SHANKS, J.H. ; SCOTT, L.J. ; HART, C.A. ; BROWN, M.: Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. A pilot study. In: *Journal of Pathology* 201 (2003), Nr. 1, S. 99–108
- [GFC99] GAO, T. ; FENG, J. ; CI, Y.: Human breast carcinomal tissues display distinctive FTIR spectra: implication for the histological characterization of carcinomas. In: *Analytical Cellular Pathology* 18 (1999), Nr. 2, S. 87–93
- [GFRC⁺11] GARCÍA-FLORES, A. F. ; RANIERO, L. ; CANEVARI, R. A. ; JALKANEN, K. J. ; BITAR, R. A. ; MARTINHO, H. S. ; MARTIN, A. A.: High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer. In: *Theoretical Chemistry Accounts* 130 (2011), Nr. 4–6, S. 1231–1238
- [GG07] GRAHN, H.F. ; GELADI, P.: *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*. 1. John Wiley & Sons Chichester, 2007. – ISBN 978-0-470-01086-0

- [GGLS12] GUMPRECHT, J.D.J. ; GEIGER, F.B. ; LUETH, T.C. ; STOLZENBURG, J.-U.: A Flat-Panel Ultrasound Robot to Align an Abdominal Ultrasound Probe During Laparoscopic Partial Nephrectomy. In: *Proceedings of ASME 2012 International Mechanical Engineering Congress and Exposition, Houston, Texas, USA 2* (2012), S. 83–92
- [GH07] GRIFFITHS, P. ; HASETH, J.A. d. ; WINEFORDNER, J.D. (Hrsg.): *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 2. John Wiley & Sons Hoboken, 2007 (Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications). – ISBN 978-0-471-19404-0
- [GHP⁺13] GAJJAR, K. ; HEPPENSTALL, L.D. ; PANG, W. ; ASHTON, K.M. ; TREVISAN, J. ; PATEL, I.I. ; LLABJANI, V. ; STRINGFELLOW, H.F. ; MARTIN-HIRSCH, P.L. ; DAWSONB, T. ; MARTIN, F.L.: Diagnostic segregation of human brain tumours using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis. In: *Analytical Methods* 5 (2013), S. 89–102
- [Gil06] *Kapitel* Modern abdominal imaging: implications for laparoscopic surgery (Remer, E.M.; Veniero, J.C. und Herts, B.R.). In: GILL, I.S. (Hrsg.): *Textbook of laparoscopic urology*. 1. Informa Healthcare New York, 2006. – ISBN 0-8493-3994-4
- [GKS14] GEIGER, F.B. ; KÖRDEL, M. ; SCHICK, A.: *Imaging by attenuated total reflection (ATR)*. Offenlegungsschrift des Deutschen Patent- und Markenamts, Veröffentlichungsnummer DE102013211814 A1, Dezember 2014
- [Grb08] GRBOVIC, D.: *Imaging by Detection of Infrared Photons Using Arrays of Uncooled Micromechanical Detectors*, University of Tennessee Knoxville, Diss., 2008
- [Gro05] GROSS, H. (.: *Handbook of Optical Systems, Volume 1, Fundamentals of Technical Optics*. 1. WILEY-VCH Verlag Weinheim, 2005. – ISBN 978-3-527-40377-6
- [GSBES10] GULLEY-STAHN, H.J. ; BLEDSOE, S.B. ; EVAN, A.P. ; SOMMER, A.J.: The Advantages of an Attenuated Total Internal Reflection Infrared Microspectroscopic Imaging Approach for Kidney Biopsy Analysis. In: *Applied Spectroscopy* 64 (2010), Nr. 1, S. 15–22
- [Har67] HARRICK, N.J.: *Internal Reflection Spectroscopy*. 1. John Wiley & Sons New York London, 1967
- [HBG05] HERING, E. ; BRESSLER, K. ; GUTEKUNST, J.: *Elektronik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. 5. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2005. – ISBN 978-3-540-24309-0

- [HBKD08a] *Kapitel Chirurgische Onkologie* (Juhl, H.). In: HENNE-BRUNS, D. (Hrsg.) ; KREMER, B. (Hrsg.) ; DÜRIG., M. (Hrsg.): *Chirurgie*. 3. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008. – ISBN 978-3-13-125293-7
- [HBKD08b] *Kapitel Chirurgische Diagnostik* (Staib, L.). In: HENNE-BRUNS, D. (Hrsg.) ; KREMER, B. (Hrsg.) ; DÜRIG, M. (Hrsg.): *Chirurgie*. 3. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008. – ISBN 978-3-13-125293-7
- [HBKM08] *Kapitel Weichteiltumoren* (Würl, P. und Bruns, J.). In: HENNE-BRUNS, D. (Hrsg.) ; KREMER, B. (Hrsg.) ; M., Dürig. (Hrsg.): *Chirurgie*. 3. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008. – ISBN 978-3-13-125293-7
- [HG11] HU, J. ; GMACHL, C.: Quantum cascade lasers enhance Mid-IR spectroscopy. In: *Photonics Spectra* 45 (2011), Nr. 12
- [Hir79] HIRSCHFELD, T.: Quantitative FT-IR: A detailed look at the problems involved. In: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Vol. 2*. Academic Press, New York, 1979, S. 193–242
- [HM05] HERING, E. ; MARTIN, R.: *Photonik. Grundlagen, Technologie und Anwendung*. 1. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2005. – ISBN 978-3-540-23438-8
- [HMS04] HERING, E. ; MARTIN, R. ; STOHRER, M.: *Physik für Ingenieure*. 9. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2004. – ISBN 3-540-21036-9
- [HMZ⁺08] HUANG, Z. ; MO, J. ; ZHENG, W. ; LOW, J. ; NG, J. ; ILANCHERAN, A.: Combining Near-infrared Autofluorescence and Raman Spectroscopy Improves the In vivo Detection of Cervical Precancer. In: *2008 Conference on Lasers and Electro-Optics* (2008), S. 1–2
- [HSK⁺02] HIROSAWA, N. ; SAKAMOTO, Y. ; KATAYAMA, H. ; TONOOKA, S. ; YANO, K.: In Vivo Investigation of Progressive Alterations in Rat Mammary Gland Tumors by Near-Infrared Spectroscopy. In: *Analytical Biochemistry* 305 (2002), Nr. 2, S. 156–165
- [Hug11] HUGHES, C.S.: *Development of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Drug Response Analysis*, School of Chemical Engineering and Analytical Sciences, University of Manchester, Diss., 2011
- [HW11] HENRICHS, B. ; WALSH, R.: Intraoperative Magnetic Resonance Imaging for Neurosurgical Procedures: Anesthetic Implications. In: *AANA Journal* 79 (2011), Nr. 1, S. 71–77

- [IHH⁺05] IKEDA, N. ; HONDA, H. ; HAYASHI, A. ; USUDA, J. ; KATO, Y. ; TSUBOI, M. ; OHIRA, T. ; HIRANO, T. ; KATO, H. ; SERIZAWA, H. ; AOKI, Y.: Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopy-based autofluorescence bronchoscopy. In: *Lung Cancer* 52 (2005), Nr. 1, S. 21–27
- [Jac02] JACKSON, J.D.: *Klassische Elektrodynamik*. 3. De Gruyter, 2002. – ISBN 3–11–016502–3
- [Jac08] JACOBS, L.: Positive Margins: The Challenge Continues for Breast Surgeons. In: *Annals of Surgical Oncology* 15 (2008), Nr. 5, S. 1271–1272
- [Jac13] JACQUES, S.L.: Optical properties of biological tissues: a review. In: *Physics in Medicine and Biology* 58 (2013), S. R37–R61
- [JCW⁺95] JACKSON, M. ; CHOO, L.P. ; WATSON, P.H. ; HALLIDAY, W.C. ; MANTSCH, H.H.: Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1270 (1995), Nr. 1, S. 1–6
- [JM97] JACKSON, M. ; MANTSCH, H.H.: The medical challenge to infrared spectroscopy. In: *Journal of Molecular Structure* 408/409 (1997), S. 105–111
- [Jon98] JONES, F.B.: A Reappraisal of the Use of Infrared Thermal Image Analysis in Medicine. In: *IEEE Transactions on Medical Imaging* 17 (1998), Nr. 6, S. 1019–1027
- [JRV⁺07] JHA, A.N. ; RAHMATHULLA, G. ; VAISHYA, S. ; WALIA, B.S. ; GUPTA, V.: Intraoperative high field magnetic resonance imaging in neurosurgery: Our initial experience with the brain suite. In: *Neurology India* 55 (2007), Nr. 2, S. 169–172
- [JWD12] JACOBSON, M.C. ; WHITE, R. deVere ; DEMOS, S.G.: In vivo testing of a prototype system providing simultaneous white light and near infrared autofluorescence image acquisition for detection of bladder cancer. In: *Journal of Biomedical Optics* 17 (2012), Nr. 3, S. 036011
- [KBK⁺08] KIM, Y.-J. ; BOCHEM, N. ; KETTER, R. ; HENN, W. ; FEIDEN, W.: Meningeome. Multiparametrische Risikostratifizierung und Grading. In: *Pathologe* 29 (2008), Nr. 6, S. 428–433
- [KBL⁺13] KISU, I. ; BANNO, K. ; LIN, L.-Y. ; UENO, A. ; ABE, T. ; KOUYAMA, K. ; OKUDA, S. ; MASUGI, Y. ; UMENE, K. ; NOGAMI, Y. ; TSUJI, K. ; MASUDA, K. ; UEKI, A. ; KOBAYASHI, Y. ; YAMAGAMI, W. ; SUSUMU, N. ; AOKI, D.:

- Preoperative and intraoperative assessment of myometrial invasion in endometrial cancer: comparison of magnetic resonance imaging and frozen sections. In: *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 92 (2013), S. 525–535
- [KC10] KAZARIAN, S.G. ; CHAN, K.L.A.: Micro- and Macro- Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging. In: *Applied Spectroscopy* 64 (2010), Nr. 5, S. 135A–152A
- [Kes07] KESSLER, W.: *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozesstechnik*. 1. WILEY-VCH Verlag Weinheim, 2007. – ISBN 978–3–527–31262–7
- [KIBH⁺09] KENDALL, C. ; ISABELLE, M. ; BAZANT-HEGEMARK, F. ; HUTCHINGS, J. ; ORR, L. ; BABRAH, J. ; BAKER, R. ; STONE, N.: Vibrational spectroscopy: A clinical tool for cancer diagnostics. In: *Analyst* 134 (2009), Nr. 6, S. 1029–1045
- [KLL97] KIDDER, L.H. ; LEVIN, I.W. ; LEWIS, E.N.: Infrared spectroscopic imaging using focal plane arrays: Applications to tissue analysis and histopathology. In: *Engineering in Medicine and Biology Society. Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE* 2 (1997), S. 689–692
- [Kne01] KNEIPP, J.: *Fourier-Transform-Infrarotmikrospektroskopische Charakterisierung transmissibler spongiformer Enzephalopathien*, Freie Universität Berlin, Diss., 2001
- [Kra07] KRAMME, R.: *Medizintechnik*. 3. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007. – ISBN 978–3–540–34102–4
- [KS06] KRAFFT, C. ; SERGO, V.: Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. In: *IOS Spectroscopy* 20 (2006), S. 195–218
- [KSG⁺06] KRAFFT, C. ; SOBOTKA, S.B. ; GEIGER, K.D. ; SCHACKERT, G. ; SALZER, R.: Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2006), Nr. 5, S. 1669–1677
- [KSS⁺14] KUBBEN, P.L. ; SCHOLTES, F. ; SCHIJNS, O.E.M.G. ; LAAK-POORT, M.P. t. ; TEERNSTRA, O.P.M. ; KESSELS, A.G.H. ; OVERBEEKE, J.J. v. ; MARTIN, D.H. ; SANTBRINK, H. v.: Intraoperative magnetic resonance imaging versus standard neuronavigation for the neurosurgical treatment of glioblastoma: A randomized controlled trial. In: *Surgical Neurology International* 5:70 (2014)

- [KSSK10] KIRSCH, M. ; SCHACKERT, G. ; SALZER, R. ; KRAFFT, C.: Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010), Nr. 4, S. 1707–1713
- [KSSS04] KRAFFT, C. ; SOBOTTKA, S.B. ; SCHACKERT, G. ; SALZER, R.: Analysis of human brain tissue, brain tumors and tumor cells by infrared spectroscopic mapping. In: *Analyst* 129 (2004), Nr. 10, S. 921–925
- [Las99] LASCH, P.: *Computergestützte Bildrekonstruktion auf Basis FTIRMikrospektrometrischer Daten humaner Tumoren*, Freie Universität Berlin, Diss., 1999
- [LASF⁺01] LACROIX, M. ; ABI-SAID, D. ; FOURNEY, D.R. ; GOKASLAN, Z.L. ; SHI, W. ; DEMONTE, F. ; LANG, F.F. ; MCCUTCHEON, I.E. ; HASSENBUSCH, S.J. ; HOLLAND, E. ; HESS, K. ; MICHAEL, C. ; MILLER, D. ; SAWAYA, R.: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiform: Prognosis, extent of resection, and survival. In: *Journal of Neurosurgery* 95 (2001), S. 190–198
- [LB05] LEVIN, W. ; BHARGAVA, R.: Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: integrating microscopy and molecular recognition. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 56 (2005), S. 429–474
- [LDD⁺06] LIPPERT, H. ; DELLER, T. ; DELVENTHAL, S. ; HERBOLD, D. ; LIPPERT-BURMESTER, W. ; ROTHKÖTTER, H.-J. ; STEINIGER, B.: *Lehrbuch Anatomie*. 7. Elsevier Urban & Fischer, München, 2006. – ISBN 978-3-437-42362-8
- [Lee09] LEE, B.G.: *Distributed Feedback Quantum Cascade Laser Arrays for Chemical Sensing*, Harvard University Cambridge, Massachusetts, Diss., 2009
- [LF14] LU, G. ; FEI, B.: Medical hyperspectral imaging: a review. In: *Journal of biomedical optics* 19 (2014), Nr. 1, S. 10901
- [LHC09] LE, T.T. ; HUFF, T.B. ; CHENG, J.X.: Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. In: *BMC cancer* 9 (2009), Nr. 42, S. 1–14
- [LHL⁺02] LASCH, P. ; HAENSCH, W. ; LEWIS, E.N. ; KIDDER, L.H. ; NAUMANN, D.: Characterization of Colorectal Adenocarcinoma Sections by Spatially Resolved FT-IR Microspectroscopy. In: *Applied Spectroscopy* 56 (2002), Nr. 1, S. 1–9
- [LHND04] LASCH, P. ; HAENSCH, W. ; NAUMANN, D. ; DIEM, M.: Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1688 (2004), Nr. 2, S. 176–186

- [Liu11] LIU, R.: Applications of Raman-based techniques to on-site and in-vivo analysis. In: *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011), Nr. 9, S. 1462–1476
- [LLC07] LIN, S.Y. ; LI, M.J. ; CHENG, W.T.: FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biodiagnosis of human tissues. In: *Spectroscopy: An International Journal* 21 (2007), Nr. 1, S. 1–30
- [LN06] LASCH, P. ; NAUMANN, D.: Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006), Nr. 7, S. 814–829
- [LS12] LIANG, D. ; SCHULDER, M.: The role of intraoperative magnetic resonance imaging in glioma surgery. In: *Surgical Neurology International* 3 (2012), S. S320–S327
- [LTO⁺96] LE, H.Q. ; TURNER, G.W. ; OCHOA, J.R. ; MANFRA, M.J. ; COOK, C.C. ; ZHANG, Y.-H.: Broad wavelength tunability of grating-coupled external cavity midinfrared semiconductor lasers. In: *Applied Physics Letters* 69 (1996), Nr. 19, S. 2804–2806
- [LXL⁺11] LIU, Y. ; XU, Y. ; LIU, Y. ; ZHANG, Y. ; WANG, D. ; XIU, D. ; XU, Z. ; ZHOU, X. ; WU, J. ; LING, X.: Detection of cervical metastatic lymph nodes in papillary thyroid carcinoma by Fourier transform infrared spectroscopy. In: *British Journal of Surgery* 98 (2011), Nr. 3, S. 380–384
- [LXZ⁺05] LI, Q.-B. ; XU, Z. ; ZHANG, N.-W. ; ZHANG, L. ; WANG, F. ; YANG, L.-M. ; WANG, J.-S. ; ZHOU, S. ; ZHANG, Y.-F. ; ZHOU, X.-S. ; SHI, J.-S. ; J.-G., Wu: In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy. In: *World Journal of Gastroenterology* 11 (2005), Nr. 3, S. 327–330
- [Mat78] MATTSON, D.: Sensitivity of a Fourier Transform Infrared Spectrometer. In: *Applied Spectroscopy* 32 (1978), Nr. 4, S. 335–338
- [MBF04] MAULINI, R. ; BECK, M. ; FAIST, J.: Broadband tuning of external cavity bound-to-continuum quantum-cascade lasers. In: *Applied Physics Letters* 84 (2004), Nr. 10, S. 1659–1661
- [MC10] MACKANOS, M.A. ; CONTAG, C.H.: Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy. In: *Trends in Biotechnology* 28 (2010), Nr. 6, S. 317–323
- [MDBU⁺13] MARTIN, M.C. ; DABAT-BLONDEAU, C. ; UNGER, M. ; SEDLMAIR, J. ; PARKINSON, D.Y. ; BECHTEL, H.A. ; ILLMAN, B. ; CASTRO, J.M. ; KEILUWEIT, M. ; BUSCHKE, D. ; OGLE, B. ; NASSE, M.J. ; HIRSCHMUGL, C.J.: 3D spectral imaging with synchrotron Fourier transform infrared spectro-microtomography. In: *Nature Methods* 10 (2013), Nr. 9, S. 861–864

- [MDS⁺07] MAZIAK, D.E. ; DO, M.T. ; SHAMJI, F.M. ; SUNDARESAN, S.R. ; PERKINS, D.G. ; WONG, P.T.T.: Fourier-transform infrared spectroscopic study of characteristic molecular structure in cancer cells of esophagus: An exploratory study. In: *Cancer Detection and Prevention* 31 (2007), S. 244–253
- [MEM14] *Datenblatt Kraftsensor KD24s*. ME-Meßsysteme GmbH, Hennigsdorf, D., 2014
- [Met78] METZ, C.E.: Basic Principles of ROC Analysis. In: *Seminars in Nuclear Medicine* 8 (1978), Nr. 4, S. 283–298
- [Mil12] MILOSEVIC, M. ; VITHA, M. F. (Hrsg.): *Internal Reflection and ATR Spectroscopy*. 1. John Wiley & Sons Hoboken, 2012 (Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications). – ISBN 978–0–470–27832–1
- [Mil13] MILOSEVIC, M.: On the Nature of the Evanescent Wave. In: *Applied Spectroscopy* 67 (2013), Nr. 2, S. 126–131
- [MJGK08] MEHROTRA, M. ; JANGIR, D.K. ; GUPTA, A. ; KANDPAL, H.C.: Differentiation of Normal and Malignant Breast Tissues using Infrared Spectroscopy. In: *Perspectives in Vibrational Spectroscopy: ICOPVS 2008, American Institute of Physics* (2008), S. 141–143
- [MJM⁺13] MORI, R. ; JOKI, T. ; MATSUWAKI, Y. ; KARAGIOZOV, K. ; MURAYAMA, Y. ; ABE, T.: Initial Experience of Real-Time Intraoperative C-Arm Computed-Tomography-Guided Navigation Surgery for Pituitary Tumors. In: *World Neurosurgery* 79 (2013), Nr. 2, S. 319–326
- [MKP05] MOSS, D.A. ; KEESE, M. ; PEPPERKOK, R.: IR microspectroscopy of live cells. In: *Vibrational Spectroscopy* 38 (2005), Nr. 1–2, S. 185–191
- [Mor04] MORDECHAI, S.: Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. In: *Journal of Microscopy* 215 (2004), Nr. 1, S. 86–91
- [MRDB05] MOHLENHOFF, B. ; ROMEO, M. ; DIEM, M. ; B.R., Wood: Mie-type scattering and non-B Beer-Lambert absorption behavior of human cells in infrared microspectroscopy. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Nr. 5, S. 3635–3640
- [MRR08] MOVASAGHI, Z. ; REHMAN, I.U. ; REHMAN, S.: Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. In: *Applied Spectroscopy Reviews* 43 (2008), Nr. 2, S. 134–179

- [MTJ⁺10] MEHROTRA, R. ; TYAGI, G. ; JANGIR, D.K. ; DAWAR, R. ; GUPTA, N.: Analysis of ovarian tumor pathology by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Journal of Ovarian Research* 3 (2010), Nr. 1, S. 1–6
- [MWT⁺96] MEURENS, M. ; WALLON, J. ; TONG, J. ; NOEL, H. ; HAOT, J.: Breast cancer detection by Fourier transform infrared spectrometry. In: *Vibrational Spectroscopy* 10 (1996), S. 341–346
- [MYI00] MAI, K.T. ; YAZDI, H.M. ; ISOTALO, P.A.: Resection margin status in lumpectomy specimens of infiltrating lobular carcinoma. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 60 (2000), Nr. 1, S. 29–33
- [New13] *Datenblatt TRA Series*. Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, D., 2013
- [NHW⁺09] NORTWICK, M. V. ; HARGROVE, J. ; WOLTERS, R. ; CRAWFORD, J.M. ; ARROYO, M. ; MACKANOS, M. ; CONTAG, C.H. ; WANG, T.D.: Fiber Optic FTIR Instrument for In Vivo Detection of Colonic Neoplasia. In: *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* 7172 (2009)
- [NPD⁺13] NALLALA, J. ; PIOT, O. ; DIEBOLD, M.D. ; GOBINET, C. ; BOUCHE, O. ; MANFAIT, M. ; SOCKALINGUM, G.D.: Infrared imaging as a cancer diagnostic tool: introducing a new concept of spectral barcodes for identifying molecular changes in colon tumors. In: *Cytometry A* 83 (2013), Nr. 3, S. 294–300
- [NWM⁺11] NASSE, M.J. ; WALSH, M.J. ; MATTSON, E.C. ; REININGER, R. ; KAJDACSYPALLA, A. ; MACIAS, V. ; BHARGAVA, R. ; HIRSCHMUGL, C.J.: High-resolution Fourier-transform infrared chemical imaging with multiple synchrotron beams. In: *Nature Methods* 8 (2011), S. 413–416
- [OI88] OHTA, K. ; ISHIDA, H.: Comparison Among Several Numerical Integration Methods for Kramers-Kronig Transformation. In: *Applied Spectroscopy* 42 (1988), Nr. 6, S. 852–957
- [OOSY03] ONIZAWA, K. ; OKAMURA, N. ; SAGINOYA, H. ; YOSHIDA, H.: Characterization of autofluorescence in oral squamous cell carcinoma. In: *Oral Oncology* 39 (2003), Nr. 2, S. 150–156
- [PCK07] PAOLONI, M.C. ; CHAND KHANNA, C.: Comparative Oncology Today. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37 (2007), Nr. 6, S. 1023–1031

- [PD06] PETIBOIS, C. ; DÉLÉRIS, G.: Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. In: *Trends in Biotechnology* 24 (2006), Nr. 10, S. 455–462
- [PDB⁺07] PETIBOIS, C. ; DROGAT, B. ; BIKFALVI, A. ; DÉLÉRIS, G. ; GÉRARD, D. ; MOENNER, M.: Histological mapping of biochemical changes in solid tumors by FT-IR spectral imaging. In: *FEBS Letters* 581 (2007), Nr. 28, S. 5469–5474
- [PGP⁺03] PALASZ, Z. ; GROBELNY, A. ; PAWLIK, E. ; FRACZEK, M. ; ZALESSKA-KRECICKA, M. ; KLIMCZAK, A. ; KRECICKI, T.: Investigation of normal and malignant laryngeal tissue by autofluorescence imaging technique. In: *Auris Nasus Larynx* 30 (2003), Nr. 4, S. 385–389
- [Pio04] PIOTROWSKI, J.: Recent Progress in Detection of long Wavelength Infrared Radiation with Advanced Heterostructure Photodetectors. In: *Proceedings of 2nd Cephona Workshop on Microscopic Characterisation of Materials and Structures for Photonics* (2004), S. 1–9
- [Psc12] PSCHYREMBEL, Redaktion d.: *Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch 2012*. 263. Walter de Gruyter Verlag, Berlin/Boston, 2012. – ISBN 978–3–11–025169–2
- [PWB⁺09] PETIBOIS, C. ; WEHBE, K. ; BELBACHIR, K. ; NOREEN, R. ; DÉLÉRIS, G.: Current Trends in the Development of FTIR Imaging for the Quantitative Analysis of Biological Samples. In: *Acta Physica Polonica A* 115 (2009), Nr. 2, S. 507–512
- [PWJ86] POWELL, J.R. ; WASACZ, F.M. ; JAKOBSEN, R.J.: An Algorithm for the Reproducible Spectral Subtraction of Water from the FT-IR Spectra of Proteins in Dilute Solutions and Adsorbed Monolayers. In: *Applied Spectroscopy* 40 (1986), Nr. 3, S. 339–344
- [Qui06] QUIMBY, R.S.: *Photonics and Lasers. An Introduction*. 1. John Wiley & Sons Hoboken New Jersey, 2006. – ISBN 978–0–471–71974–8
- [RD05] ROMEO, M. ; DIEM, M.: Correction of dispersive line shape artifact observed in diffuse reflection infrared spectroscopy and absorption/reflection (transflection) infrared micro-spectroscopy. In: *Vibrational Spectroscopy* 38 (2005), S. 129–132
- [Rei05] REIDER, G.A.: *Photonik. Eine Einführung in die Grundlagen*. 2. Springer Verlag Wien, 2005. – ISBN 3–211–21901–3
- [RH97] RAHMELOW, K. ; HÜBNER, W.: Infrared spectroscopy in aqueous solution: Difficulties and accuracy of water subtraction. In: *Applied Spectroscopy* 51 (1997), Nr. 2, S. 160–170

- [RHND06] RASSOW, J. ; HAUSER, K. ; NETZKER, R. ; DEUTZMANN, R. ; A. BOB, K. B. (Hrsg.): *Biochemie*. 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006 (Duale Reihe). – ISBN 978-3-13-125351-4
- [RMG⁺10] RAMINA, R. ; MAURICIO, C.N. ; GIACOMELLI, A. ; BARROS, E. ; VOSGERAU, R. ; NASCIMENTO, A. ; COELHO, G.: Optimizing costs of intraoperative magnetic resonance imaging. A series of 29 glioma cases. In: *Acta Neurochirurgica* 152 (2010), Nr. 1, S. 27–33
- [RMGW90] RIGAS, R. ; MORGELLO, S. ; GOLDMAN, I.S. ; WONG, P.T.T.: Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), S. 8140–8144
- [RMRD10] REHMAN, S. ; MOVASAGHI, Z. ; REHMAN, I.U. ; DARR, J.A.: Fourier transform infrared spectroscopic analysis of breast cancer tissues; Identifying differences between normal breast, invasive ductal carcinoma, and ductal carcinoma in situ of the breast. In: *Applied Spectroscopy Reviews* 45 (2010), Nr. 5, S. 355–368
- [Rog05] ROGALSKI, A.: HgCdTe infrared detector material: history, status and outlook. In: *Reports on Progress in Physics* 68 (2005), S. 2267–2336
- [Rot12] ROTH, A.: *Medizinische Anwendungen von ATR-FTIR-Spektroskopie zur reagenzienfreien und quantitativen Analyse von Körperflüssigkeiten*, Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Diss., 2012
- [RW92] RIGAS, B. ; WONG, P.T.T.: Human Colon Adenocarcinoma Cell Lines Display Infrared Spectroscopic Features of Malignant Colon Tissues. In: *Cancer Research* 52 (1992), S. 84–88
- [SAR⁺01] SALMAN, A. ; ARGOV, S. ; RAMESH, J. ; GOLDSTEIN, J. ; SINELNIKOV, I. ; GUTERMAN, H. ; MORDECHAI, S.: FT-IR microscopic characterization of normal and malignant human colonic tissues. In: *Cellular and molecular biology* 47 (2001)
- [Sch68] SCHRÖDINGER, E.: Quantization as an Eigenvalue Problem. Second Communication. In: LUDWIG, G. (Hrsg.): *Wave mechanics*. 1. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford, 1968, S. 106–126
- [Sch13] SCHMÜSER, P.: *Theoretische Physik für Studierende des Lehramts 2. Elektrodynamik und Spezielle Relativitätstheorie*. 1. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2013. – ISBN 978-3-642-25395-9

- [Seg81] SEGELSTEIN, D.J.: *The complex refractive index of water*, University of Missouri-Kansas City, Diplomarbeit, 1981
- [SFMF13] SOLEMAN, J. ; FATHI, A.-R. ; MARBACHER, S. ; FANDINO, J.: The role of intraoperative magnetic resonance imaging in complex meningioma surgery. In: *Magnetic Resonance Imaging* 31 (2013), S. 923–929
- [SGS⁺09] SOBOTTKA, S.B. ; GEIGER, K.D. ; SALZER, R. ; SCHACKERT, G. ; KRAFFT, C.: Suitability of infrared spectroscopic imaging as an intraoperative tool in cerebral glioma surgery. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (2009), Nr. 1, S. 187–195
- [SH07] SMITT, M.C. ; HORST, K.: Association of Clinical and Pathologic Variables with Lumpectomy Surgical Margin Status after Preoperative Diagnosis or Excisional Biopsy of Invasive Breast Cancer. In: *Annals of Surgical Oncology* 14 (2007), Nr. 3, S. 1040–1044
- [SH08] SIEBERT, F. ; HILDEBRANDT, P.: *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. 1. Wiley-VCH Verlag Weinheim, 2008. – ISBN 978-3-527-40506-0
- [Sha09] SHAO, X.: Near-infrared autofluorescence imaging for colonic cancer detection. In: *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering* 7634 (2009), S. 76340B
- [SHM⁺11] SHERMAN, J.H. ; HOES, K. ; MARCUS, J. ; KOMOTAR, R.J. ; BRENNAN, C.W. ; GUTIN, P.H.: Neurosurgery for brain tumors: update on recent technical advances. In: *Current neurology and neuroscience reports* 11 (2011), Nr. 3, S. 313–319
- [SK99] SNIVELY, C.M. ; KOENIG, J.L.: Characterizing the Performance of a Fast FT-IR Imaging Spectrometer. In: *Applied Spectroscopy* 53 (1999), Nr. 2, S. 170–177
- [SK13] S.G., Kazarian ; K.L., Chan: ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. In: *Analyst* 138 (2013), Nr. 7, S. 1940–1951
- [SK14] STEINER, G. ; KIRSCH, M.: Optical spectroscopic methods for intraoperative diagnosis. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014), Nr. 1, S. 21–25
- [SLB⁺11] SOLBERG, O.V. ; LINDSETH, F. ; BO, L.E. ; MULLER, S. ; BAKENG, J.B. ; TANGEN, G.A. ; HERNES, T.A.N.: 3D ultrasound reconstruction algorithms from analog and digital data. In: *Ultrasonics* 51 (2011), Nr. 4, S. 405–419

- [SM00] SHAW, R.A. ; MANTSCH, H.H.: Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Chichester, 2000, S. 83–102
- [Smi98] SMITH, B.C.: *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2. CRC Press, 1998. – ISBN 978-1-4200-6930-3
- [SN07] SZE, S.M. ; NG, K.K.: *Physics of Semiconductor Devices*. 3. John Wiley & Sons Hoboken, 2007. – ISBN 0-471-14323-5
- [SPM⁺06] STUMMER, W. ; PICHLMEIER, U. ; MEINEL, T. ; WIESTLER, O.D. ; ZANELLA, F. ; REULEN, H.-J.: Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. In: *Lancet Oncology* 7 (2006), S. 392–401
- [SRG⁺07] STUPP, R. ; RENI, M. ; GATTA, G. ; MAZZAB, E. ; VECHT, C.: Anaplastic astrocytoma in adults. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 63 (2007), S. 72–80
- [SSCS⁺03] STEINER, G. ; SHAW, A. ; CHOO-SMITH, L.P. ; ABUID, M.H. ; SCHACKERT, G. ; SOBOTTKA, S. ; STELLER, W. ; SALZER, R. ; MANTSCH, H.H.: Distinguishing and grading human gliomas by IR spectroscopy. In: *Biopolymers* 72 (2003), Nr. 6, S. 464–471
- [SSK⁺11] STELLING, A. ; SALZER, S. ; KIRSCH, M. ; SOBOTTKA, S.B. ; GEIGER, K. ; KOCH, E. ; SCHACKERT, G. ; STEINER, G.: Intra-operative optical diagnostics with vibrational spectroscopy. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011), Nr. 9, S. 2745–2753
- [ST07] SCHRÖDER, G. ; TREIBER, H.: *Technische Optik*. 10. Vogel Buchverlag, Würzburg, 2007. – ISBN 978-3-8343-3086-4
- [ST08] SALEH, B.E.A. ; TEICH, M.C.T.: *Grundlagen der Photonik*. 2. WILEY-VCH Verlag Weinheim, 2008. – ISBN 978-3-527-40677-7
- [STB08] SKORNYAKOV, I. ; TOLSTOROZHEV, G. ; BUTRA, V.: Infrared absorption spectra of human malignant tumor tissues. In: *Journal of Applied Spectroscopy* 75 (2008), Nr. 3, S. 420–425
- [Ste73] STEKETEE, J.: Spectral Emissivity of Skin and Pericardium. In: *Physics in Medicine and Biology* 18 (1973), Nr. 5, S. 686–694

- [SV03] *Kapitel* Mid-Infrared Laser Applications in Spectroscopy (Tittel, F.K.; Richter, R. und Fried, A.). In: SOROKINA, I.T. (Hrsg.) ; VODOPYANOV, K.L. (Hrsg.): *Solid-State Mid-Infrared Laser Sources*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2003. – ISBN 978-3-13-125293-7, S. 445–516
- [Sva91] SVANBERG, S. ; SCHAWLOW, A.L. (Hrsg.) ; SHIMODA, K. (Hrsg.): *Atomic and molecular spectroscopy. Basic aspects and practical applications*. 1. Springer Verlag New York Berlin Heidelberg, 1991 (Atoms and Plasmas). – ISBN 0-387-52594-7
- [SXW⁺13] SUN, X. ; XU, Y. ; WU, J. ; ZHANG, Y. ; SUN, K.: Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy – a pilot study of 60 samples. In: *J Surg Res* 179 (2013), Nr. 1, S. 33–38
- [SZH⁺09] SENG, K.T. ; ZHENG, W. ; HUANG, Z. ; KHEK, Y.H. ; KHAY, G.Y. ; TEH, M.: Image-guided Raman endoscopy for in vivo detection of high grade dysplasia in gastric. In: *2009 Conference on Lasers and Electro-Optics and 2009 Conference on Quantum Electronics and Laser Science Conference, CLEO/QELS 2009* (2009)
- [TBC⁺99] TIDROW, M.Z. ; BECK, W.A. ; CLARK, W.W. ; POLLEHN, H.K. ; LITTLE, J.W. ; DHAR, N.K. ; LEAVITT, R.P. ; KENNERLY, S.W. ; BEEKMAN, D.W. ; GOLDBERG, A.C. ; DYER, W.R.: Device physics and focal plane array applications of QWIP and MCT. In: *Opto-electronics Review* 7 (1999), Nr. 4, S. 283–296
- [TPM⁺06] TFAYLI, A. ; PIOT, O. ; MANFAIT, M. ; DERANCOURT, S. ; BERNARD, P. ; CADIOT, G. ; DIEBOLD, M.D.: In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: Examination of human skin lesions and esophagus Barrett’s mucosa on an animal model. In: *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* (2006) 6093 (2006)
- [TPW⁺10] TRAVO, A. ; PIOT, O. ; WOLTHUIS, R. ; GOBINET, C. ; MANFAIT, M. ; BARA, J. ; FORGUE-LAFITTE, M.E. ; JEANNESSON, P.: IR spectral imaging of secreted mucus: a promising new tool for the histopathological recognition of human colonic adenocarcinomas. In: *Histopathology* 56 (2010), Nr. 7, S. 921–931
- [UG09] *Kapitel* Laparoscopic Ultrasonography (Matin, S.F.). In: UKIMURA, O. (Hrsg.) ; GILL, I.S. (Hrsg.): *Contemporary Interventional Ultrasonography in Urology*. 1. Springer Verlag London, 2009. – ISBN 978-1-84800-217-3
- [Uki10] UKIMURA, O.: Image-guided surgery in minimally invasive urology. In: *Current opinion in urology* 20 (2010), Nr. 2, S. 136–140

- [UOK⁺08] UKIMURA, O. ; OKIHARA, K. ; KAMOI, K. ; NAYA, Y. ; OCHIAI, A. ; MIKI, T.: Intraoperative ultrasonography in an era of minimally invasive urology. In: *International Journal of Urology* 15 (2008), S. 673–680
- [Vig13] *Infrared Detectors and Related Electronic Devices*. Vigo Systems S.A., Ozarow Mazowiecki, Polen, 2013
- [WCC⁺99] WANG, C.-Y. ; CHIANG, H.K. ; CHEN, C.-T. ; CHIANG, C.-P. ; KUO, Y.-S. ; CHOW, S.-N.: Diagnosis of oral cancer by light-induced autofluorescence spectroscopy using double excitation wavelengths. In: *Oral Oncology* 35 (1999), Nr. 2, S. 144–150
- [WCR⁺10] WEIDA, M.J. ; CAFFEY, D. ; ROWLETTE, J.A. ; ARNONE, D.F. ; DAY, T.: Utilizing broad gain bandwidth in quantum cascade devices. In: *Optical Engineering* 49 (2010), Nr. 1, S. 111120
- [WCY⁺04] WOOD, B.R. ; CHIRIBOGA, L. ; YEE, H. ; QUINN, M.A. ; MCNAUGHTON, D. ; DIEM, M.: Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. In: *Gynecologic Oncology* 93 (2004), Nr. 1, S. 59–68
- [WHO14] *WHO International Agency for Research on Cancer. Press Release No 224*. World Health Organisation, 2014
- [WK98] WIRTZ, C.R. ; KUNZE, S.: Neuronavigation: Computerassistierte Neurochirurgie. In: *Deutsches Ärzteblatt* 95 (1998), Nr. 39, S. A–2384–2390
- [WKM14] WOOD, BR ; KIUPEL, M. ; MCNAUGHTON, D.: Progress in Fourier transform infrared spectroscopic imaging applied to venereal cancer diagnosis. In: *Vet Pathol.* 51 (2014), Nr. 1, S. 224–237
- [WN05] WARTEWIG, S. ; NEUBERT, R.H.H.: Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005), S. 1144–1170
- [Won09] *Erweiterter Reprint des Artikels „Photoconductive HgCdTe Detectors for CO₂ Laser Applications“ von Wong, T.T.S.; Lasers & Applications; Februar 1987 issue; pp. 59-61*. Laser Components GmbH, Olching, D., April 2009
- [WPR91] WONG, P.T.T. ; PAPAVALASSIOU, E.D. ; RIGAS, B.: Phosphodiester Stretching Bands in the Infrared Spectra of Human Tissues and Cultured Cells. In: *Applied Spectroscopy* 45 (1991), Nr. 9, S. 1563–1567

- [WQT⁺98] WOOD, B.R. ; QUINN, M.A. ; TAIT, B. ; ASHDOWN, M. ; HISLOP, T. ; ROMEO, M. ; MCNAUGHTON, D.: FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. In: *Biospectroscopy* 4 (1998), Nr. 2, S. 75–91
- [WR90] WONG, P.T.T. ; RIGAS, B.: Infrared Spectra of Microtome Sections of Human Colon Tissues. In: *Applied Spectroscopy Notes* 44 (1990), Nr. 10, S. 1715–1718
- [WST⁺06] WILLEMS, P.W.A. ; SPRENKEL, J.W. Berkelbach van d. ; TULLEKEN, C.A.F. ; VIERGEVER, M.A. ; TAPHOORN, M.J.B.: Neuronavigation and surgery of intracerebral tumours. In: *Journal of Neurology* 253 (2006), S. 1123–1136
- [WTN⁺08] WOLTHUIS, R. ; TRAVO, A. ; NICOLET, C. ; NEUVILLE, A. ; GAUB, M.-P. ; GUENOT, D. ; LY, E. ; MANFAIT, M. ; JEANNESSON, P. ; PIOT, O.: IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas. In: *Analytical Chemistry* 80 (2008), Nr. 22, S. 8461–8469
- [Wü10] WÜRFEL, D.: *Rauscharme Ausleseschaltungen für die FIR-Sensorik*, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Duisburg-Essen, Diss., 2010
- [WXS⁺01] WU, J.G. ; XU, Y.Z. ; SUN, C.W. ; SOLOWAY, R.D. ; XU, D.F. ; WU, Q.G. ; SUN, K.H. ; WENG, S.F. ; XU, G.X.: Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques. In: *Biopolymers* 62 (2001), Nr. 4, S. 185–192
- [WYT⁺94] WALLON, J. ; YAN, S. H. ; TONG, J. ; MEURENS, M. ; HAOT, J.: Identification of Breast Carcinomatous Tissue by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. In: *Applied Spectroscopy* 48 (1994), Nr. 2, S. 190–193
- [XLG⁺11] XIE, Y.-B. ; LIU, Q. ; GUO, C.-G. ; WANG, C.-F. ; ZHAO, P. ; HE, F.: Diagnosis of colon cancer with fourier transform infrared spectroscopy on the malignant colon tissue samples. In: *Chinese Medical Journal* 124 (2011), Nr. 16, S. 2517–2521
- [Yeh05] YEH, P. ; SALEH, B.E. (Hrsg.): *Optical Waves in Layered Media*. 1. John Wiley & Sons Hoboken, 2005 (Pure and Applied Optics). – ISBN 978-0-471-73192-4
- [YKLB15] YEH, K. ; KENKEL, S. ; LIU, J.N. ; BHARGAVA, R.: Fast infrared chemical imaging with a quantum cascade laser. In: *Analytical Chemistry* 87 (2015), Nr. 1, S. 485–493
- [YOG⁺00] YANO, K. ; OHOSHIMA, S. ; GOTOU, Y. ; KUMAIIDO, K. ; MORIGUCHI, T. ; KATAYAMA, H.: Direct Measurement of Human Lung Cancerous and Noncancerous

Tissues by Fourier Transform Infrared Microscopy: Can an Infrared Microscope Be Used as a Clinical Tool? In: *Analytical Biochemistry* 287 (2000), Nr. 2, S. 218–225

[YSH⁺03] YANO, K. ; SAKAMOTO, Y. ; HIROSAWA, N. ; TONOOKA, S. ; KATAYAMA, H. ; KUMAIDO, K. ; SATOMI, A.: Applications of Fourier transform infrared spectroscopy, Fourier transform infrared microscopy and near-infrared spectroscopy to cancer research. In: *Spectroscopy* 17 (2003), Nr. 2–3, S. 315–321

[YSZ14] YAO, H. ; SHI, X. ; ZHANG, Y.: The Use of FTIR-ATR Spectrometry for Evaluation of Surgical Resection Margin in Colorectal Cancer: A Pilot Study of 56 Samples. In: *Journal of Spectroscopy* 2014, Article ID 213890 (2014), S. 1–4

[YWMG87] YOON, G. ; WELCH, A. ; MOTAMEDI, M. ; GEMERT, M. v.: Development and Application of Three-Dimensional Light Distribution Model for Laser Irradiated Tissue. In: *IEEE Journal of Quantum Electronics* 23 (1987), Nr. 10, S. 1721–1733

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name Florian Geiger
Geburtsdatum/-Ort 16. Dezember 1986 in Bamberg

Beruf, Studium und Schule

seit 07/2012 **Universität Stuttgart**, Institut für Technische Optik
Doktorand bei Prof. Dr. Alois Herkommer

seit 05/2012 **Siemens AG**, Corporate Technology (CT RTC SET INT-DE)
Forschung als externer Mitarbeiter (Doktorand)
Ernst von Siemens Promotionsstipendium

10/2006 - 03/2012 **Technische Universität München** (TU München)
Diplomstudium Maschinenwesen (Vordiplom 11/2008)

09/2011 - 03/2012 **TU München**, Lehrstuhl für Mikrotechnik und Medizingerätetechnik
Diplomarbeit im Bereich Medizinrobotik bei Prof. Dr. Tim C. Lüth

01/2011 - 07/2011 **TU München**, Lehrstuhl für Mikrotechnik und Medizingerätetechnik
Semesterarbeit im Bereich Medizinrobotik bei Prof. Dr. Tim C. Lüth

10/2010 - 03/2011 **TU München**, Institut für Werkzeugmaschinen und Betriebswissenschaften: Semesterarbeit im Bereich flexible Produktionskapazitäten bei Prof. Dr. Gunther Reinhart

04/2010 - 10/2010 **CLAAS INDIA Pvt. Ltd.**, Chandigarh, Indien
Praktikum im Bereich schlanke Produktion (Urlaubssemester)

11/2007 - 02/2008 **TU München**, Lehrstuhl für Umformtechnik und Gießereiwesen
Studentische Hilfskraft im Bereich Analyse von Gusswerkstücken

07/2006 - 09/2006 **Albert & Hummel GmbH**, Bamberg
Praktikum in der Fertigung und Montage

09/1997 - 06/2006 **E.T.A. Hoffmann-Gymnasium Bamberg**
Allgemeine Hochschulreife