

Aus dem Institut für Biomedizinische Optik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Alfred Vogel



„Multiphotonenmikroskopie mit einem aktiv modulierten Faserlaser“

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Matthias Eibl
aus Passau

Lübeck 2018

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. Robert Huber

2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 8. August 2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27. August 2018

Kurzfassung

Die Multiphotonenmikroskopie ist eine etablierte Bildgebungsmethode, die breite Anwendung in der bio-medizinischen Forschung findet. Vor allem die Möglichkeit in stark streuendes Gewebe einzudringen und so die zu untersuchende Probe mit mikroskopischer Auflösung dreidimensional abtasten zu können hat diese Methode so erfolgreich gemacht. Die Anwendung ist aktuell jedoch auf optische Labore beschränkt, da aufwendige Ultrakurzpulslasersysteme benötigt werden, die hohe Anforderungen an die Umgebung stellen.

Ziel dieser Arbeit war es daher eine alternative Lichtquelle zu entwickeln, die einfacher handhabbar und robuster ist und diese auf die Anwendbarkeit für die Multiphotonenbildung hin zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür ein aktiv modulierter Faserlaser entwickelt und detailliert untersucht. Dieser Laser, der Sub-Nanosekunden Pulse bei einer Wellenlänge von 1064 nm bereitstellt, wurde mit einem kommerziell erhältlichen Ultrakurzpulslaser verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass man bei gleichem Tastverhältnis der Laser auch die gleiche Bildqualität erhält. Um die spektrale Beschränkung auf eine Wellenlänge aufzuheben, wurden nichtlineare Effekte in der Faser genutzt, um zwei weitere Anregungswellenlängen zu erzeugen.

Diese faserbasierte Anregungslichtquelle wurde für weitere Untersuchungen in ein Selbstbau-Multiphotonenmikroskop integriert. Damit konnten Multiphotonenaufnahmen von verschiedenen Proben aufgenommen werden und erste Untersuchungen zur Verträglichkeit der längeren Pulse mit biologischem Gewebe angestellt werden.

Die Besonderheit der längeren Pulse kombiniert mit einer hohen analogen Detektionsbandbreite hat außerdem noch eine neue Art ermöglicht, um Fluoreszenzlebenszeiten zu messen. Durch die sogenannte single-pulse FLIM Methode konnte die Fluoreszenzlebenszeitbildung (engl. fluorescence lifetime imaging, FLIM) deutlich beschleunigt werden und statt typischen Pixelraten von ~ 10 kHz konnten FLIM Aufnahmen mit Pixelraten bis zu 1 MHz gezeigt werden.

Die robuste Lichtquelle in Kombination mit dem flexiblen Mikroskopieaufbau könnte ein Schritt zu einer kompakten Multiphotonenbildgebungsplattform sein, um mehr Forschern diese wertvolle Bildgebungsmethode zur Verfügung stellen zu können.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	5
Inhaltsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
2 Aktiv modulierter Faserlaser als Anregungslichtquelle für Nichtlineare Bildgebung	11
2.1 Konzept des Anregungslasers: Master-Oscillator Power Amplifier	14
2.1.1 Prinzipieller Aufbau des MOPA-Lasers	15
2.1.2 Seed-Puls Erzeugung	16
2.2 Verstärkung der 1064 nm Pulse	20
2.2.1 Kerngepumpter YDFA	20
2.2.2 Mantelgepumpter YDFA	23
2.3 Charakterisierung der 1064 nm Pulse	27
2.4 Wellenlängenverschiebung mittels SRS und FWM	30
2.4.1 Theorie und Grundlagen	30
2.4.2 Parameteroptimierung für die Erzeugung verschiedener Wellenlängen durch SRS und FWM	31
2.4.3 Bestätigung der Theorie der Wellenlängenverschiebung durch qualitative Überlegungen und Simulation	34
2.4.4 Puls-zu-Puls Wellenlängenschalten durch Modulation der Seed-Dioden	37
2.5 Fazit und Ausblick aktiv modulierter Faserlaser	40
3 Multiphotonenmikroskopie mit Sub-Nanosekunden Pulsen	42
3.1 Vergleich des Sub-Nanosekunden Lasers mit einem Ultrakurzpulslaser	44
3.1.1 Theoretische Überlegungen bezüglich der Unterschiede in Pulslänge und Repetitionsrate	44
3.1.2 Bildgebung am TriM-Scope I mit MOPA-Laser und Ultrakurzpulslaser	48
3.1.3 Ergebnisse und Auswertung	50
3.1.4 Fazit Vergleich Ultrakurzpulslaser mit Sub-Nanosekunden Laser	57
3.2 Entwicklung und Aufbau eines Eigenbau Multiphotonenmikroskops	58
3.2.1 Optische Auslegung des Multiphotonenmikroskops	58
3.2.2 Datenerfassung und Synchronisierung des Selbstbau-Multiphotonenmikroskops	62
3.3 Multiphotonenmikroskopie mit 1064 nm Anregung am Eigenbaumikroskop	65
3.3.1 TPEF – Bildgebung an einem <i>Convallaria majalis</i> Pflanzenstängel	65
3.3.2 Probleme bei der Bildgebung	69
3.3.3 SHG – und TPEF – Bildgebung an Mäusegewebe	70
3.4 Multiphotonenmikroskopie mit langen Wellenlängen	72
3.4.1 Konfiguration des Multiphotonenmikroskops für TPEF-Bildgebung bei 1122 nm und 1186 nm	72

3.4.2	Bildgebung an gefärbten COS-7 Zellen	73
3.5	Fazit Multiphotonenbildung mit Sub-Nanosekunden Pulsen.....	76
4	Single-Pulse Two-Photon Excited Fluorescence Lifetime Imaging: SP-FLIM.....	77
4.1	Experimenteller Aufbau der SP-FLIM Bildgebungsplattform	81
4.2	Datenerfassung für SP-FLIM	82
4.3	Datenverarbeitung für Lebenszeitbestimmung.....	83
4.4	Charakterisierung des SP-FLIM Aufbaus	86
4.4.1	Bestimmung der Apparatefunktion (IRF)	86
4.4.2	Bestimmung der Lebenszeit einer Probe mit einfach-exponentiellem Abfall...88	
4.5	SP-FLIM Bildgebung und Interpretation der Daten	91
4.5.1	Bildgebung mit bis zu 1 MHz Pixelrate.....	91
4.5.2	Vergleich Tail-Fit vs. Fit mit IRF	94
4.5.3	Multi-Komponenten Kontrast anhand unterschiedlicher Lebenszeiten	95
4.6	Zusammenfassung SP-FLIM	97
5	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	98
	Literaturverzeichnis.....	100
	Abkürzungsverzeichnis.....	i
	Betreute Arbeiten	ii
	Publikationsliste	iii
	Lebenslauf	vi
	Danksagung	vii

1 Einleitung

Mit einem Mikroskop versucht man kleinste Dinge sichtbar zu machen, die mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen sind. Dieser einfache Grundgedanke treibt seit jeher die Entwicklung neuer mikroskopischer Verfahren an.

Klassische Mikroskope nutzen dabei die Streuung von Licht an Materie als kontrastgebendes Phänomen aus: eine Probe wird zum Beispiel von unten beleuchtet und mit einem Objektiv wird das transmittierte Licht aufgesammelt. Ein Okular erzeugt dann auf der Netzhaut des Auges ein vergrößertes Abbild dieser Probe. Stellen, an denen das Licht gestreut oder absorbiert wurde, erscheinen dunkel und Orte, die das Licht passieren konnte erscheinen hell. Man erhält somit einen hell-dunkel Kontrast, der einem Aufschluss über die Morphologie der Probe gibt.

Diese vergrößerte Darstellung der Struktur von kleinsten Proben hat vielen Wissenschaftlern im Bereich der biomolekularen Forschung tiefen Einblick in die Vorgänge auf zellulärer Ebene ermöglicht. Um jedoch ein noch größeres Verständnis der Funktion von Zellen und von Stoffwechselfvorgängen zu erhalten, werden ständig neue Verfahren entwickelt, um nicht nur die Struktur, sondern auch die chemische Zusammensetzung einer Probe sichtbar zu machen. Besonders die Fluoreszenzbildgebung hat sich als leistungsfähige Mikroskopiemethode etabliert, die in verschiedensten Bereichen in der Medizin und in der biomolekularen Forschung breite Anwendung findet.

Fluoreszenzmikroskopie nutzt aus, dass bestimmte Moleküle – Farbstoffe oder auch Fluorophore genannt – mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden können und dann Licht bei einer anderen, längeren Wellenlänge abgeben. Diese farbstoffspezifischen charakteristischen Absorptions- und Emissionsspektren erlauben eine Unterscheidung verschiedener Strukturen.

Diese spezifische Bildgebungsmethode kann besonders gut bei dünnen Präparaten eingesetzt werden. Für dickere Proben, bei denen man auch Informationen aus tieferliegenden Schichten gewinnen möchte, ist diese Methode jedoch aus mehreren Gründen nicht einsetzbar. Zum einen ist es schwierig zu bestimmen, aus welcher Tiefe das Fluoreszenzsignal stammt, weil prinzipiell auf dem gesamten Weg durch die Probe Fluorophore angeregt werden können. Zum anderen kann mit den typischen Wellenlängen für Fluoreszenzbildgebung im sichtbaren Spektralbereich nur wenig weit in streuendes Gewebe eingedrungen werden. Für viele Anwendungsgebiete ist es jedoch essentiell, Signal auch aus tieferen Schichten aufnehmen zu können.

Abhilfe schafft hier die Multiphotonenmikroskopie. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Anregung mit Licht im sichtbaren Spektralbereich, nutzt man Licht mit deutlich längeren Wellenlängen im Nahinfraroten. Die Energie eines einzelnen Photons reicht dann nicht mehr aus, um ein fluoreszierendes Molekül in einen angeregten Zustand zu versetzen. Im Jahre 1931 wurde von Maria Goeppert-Mayer jedoch ein Vorgang [1] theoretisch beschrieben, bei dem eine Anregung eines höheren Energiezustandes in einem Atom oder Molekül auch mit zwei Photonen möglich ist, die jeweils nur die Hälfte der Energie haben, die nötig ist, um das Molekül vom Grundzustand in den angeregten Zustand zu heben. Dieser Vorgang wird als Zweiphotonenabsorption bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit für eine solche Zweiphotonenabsorption ist sehr gering und somit wird eine hohe Photonendichte benötigt um den Effekt zu sehen. So konnte dieser Effekt erst im Jahre 1961 von Kaiser und Garrett [2] nachgewiesen werden, kurz nach der Erfindung des Lasers durch Maiman [3] 1960. Es dauerte dann noch fast 30 Jahre, bis Denk, Strickler und Webb [4] die Zweiphotonenabsorption für die Mikroskopie verwendet haben.

Mit der Zweiphotonenmikroskopie (engl. two-photon excitation fluorescence microscopy, TPEF – microscopy) konnte seit diesem Zeitpunkt dreidimensionale optische Bildgebung mit chemischer Spezifität gemacht werden. Neben dem Vorteil Eindringtiefen von 1-2 Millimeter bei lateralen Auflösungen im sub-Mikrometerbereich zu ermöglichen, gibt es noch weitere entscheidende Vorteile der Multiphotonenanregung im Vergleich zur Einphotonenanregung. Die Anregung von Fluorophoren und besonders die Mehrfachanregung selbiger können zu chemischen Veränderungen der Moleküle führen, die potentiell toxisch für umliegende Bereiche sind. Die dadurch hervorgerufenen Schäden, zusammenfassend als Photoschäden bezeichnet, beschränken sich bei der Multiphotonenanregung auf das Fokussvolumen und fallen insgesamt niedriger aus, da die Anregungswahrscheinlichkeiten für Mehrfachanregungen deutlich geringer sind, als bei der Einphotonenabsorption [5, 6]. Besonders schädlich ist dabei eine Anregung mit hochenergetischem UV-Licht, das Moleküle direkt ionisieren kann. Eine direkte Anregung mit UV-Licht würde eine enorme Belastung für das umliegende Gewebe bedeuten. Mit der Multiphotonenanregung ist es möglich mit weniger schädlichem Licht anzuregen und trotzdem Informationen dieser Moleküle zu erhalten. Da das Signal nur im Fokus erzeugt wird, kann auf eine konfokale Detektion verzichtet werden, die ansonsten nötig ist, um Streulicht aus unterschiedlichen Tiefen zu unterdrücken. Neben dem Verzicht auf das konfokale Pinhole, können für das Trennen des Fluoreszenzlichts vom Anregungslicht breitbandig einsetzbare Filter verwendet werden, da die beiden Wellenlängen weit auseinander liegen. Diese beiden technischen Details vereinfachen den

optischen Aufbau bereites enorm im Vergleich zu einem konfokalen Mikroskop [7, 8].

Trotz der genannten Vorteile der Multiphotonenmikroskopie gegenüber der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie gibt es einen entscheidenden Nachteil: Die Multiphotonenmikroskopie ist aktuell auf teure und technisch komplexe Lichtquellen angewiesen [7, 9-11].

Der am meisten eingesetzte Laser für die Multiphotonenanregung ist ein optisch gepumpter Titan:Saphir-Laser (Ti:Sa-Laser). Obwohl diese Laser in der Regel ideale Anregungsparameter besitzen, verhindern der aufwendige Betrieb und die hohen Anschaffungskosten eine breite Anwendung der Zweiphotonenmikroskopie [9, 12]. So wird aktuell ein ganzes optisches Labor benötigt, um die nötigen Voraussetzungen für einen reibungslosen Betrieb zu erfüllen. Obwohl die Laser immer zuverlässiger wurden [13], ist für den Betrieb und die Wartung oftmals immer noch ein Mitarbeiter eingesetzt. Zusammen mit Kosten für den Laser im Bereich von 100.000 € [9], ist der Einsatz der Multiphotonenmikroskopie auf spezielle Optiklabore beschränkt.

Um diese wertvolle Bildgebungsmethode auch außerhalb von Optiklaboren anwenden zu können, werden daher einfachere, robustere und günstigere Lichtquellen benötigt. Diese Problemstellung wird in dieser Arbeit aufgegriffen:

Ziel der hier dargelegten Forschung war es, einen neuartigen Faserlaser zu entwickeln und diesen auf die Anwendbarkeit für die Multiphotonenbildung hin zu untersuchen.

Dafür wurde ein aktiv modulierter Faserlaser entwickelt, der kostengünstiger und vor allem robuster und leichter handzuhaben ist, als bestehende Ti:Sa Laser. In dieser Arbeit wird dieser Laser detailliert beschrieben und charakterisiert und verschiedene Anwendungen in der Multiphotonenbildung dargestellt.

Die vorliegende Dissertation ist in drei Hauptbereiche unterteilt, denen jeweils ein kurzer Grundlagenteil vorangestellt ist. Im ersten Hauptabschnitt wird die Lichtquelle ausführlich behandelt. Im zweiten Abschnitt wird die Leistungsfähigkeit des Laser für Multiphotonenbildung untersucht, ein Vergleich mit einem Ti:Sa Laser angestellt und die Entwicklung eines Selbstbau-Multiphotonenmikroskops dargestellt, das auf diesen Faserlaser als Anregungslichtquelle optimiert ist. Im Laufe der Forschung zur Lichtquelle und der Multiphotonenbildung damit hat sich herausgestellt, dass die besonderen Eigenschaften des Lasers es ermöglichen, Fluoreszenzlebenszeiten besonders schnell zu messen. Diese neuartige Methode wird im dritten Teil dieser Arbeit präsentiert.

2 Aktiv modulierter Faserlaser als Anregungslichtquelle für Nichtlineare Bildgebung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte erst nach der Erfindung des Lasers durch Maiman [3] im Jahre 1960, der Effekt der Zweiphotonenabsorption von Kaiser und Garrett [2] im Jahre 1961 nachgewiesen werden.

Grund dafür ist, dass die Zweiphotonenabsorption ein sehr unwahrscheinlicher Prozess ist und man diesen erst bei sehr hohen Lichtintensitäten beobachten kann. Nur durch die hohe optische Leistung und gute Fokussierbarkeit von Laserlicht konnte diese Voraussetzung geschaffen werden. Bis dieser Effekt für die Bildgebung genutzt werden konnte, vergingen jedoch nochmals knapp 30 Jahre. Für die Bildgebung muss die Lichtquelle nämlich noch weitere Voraussetzungen erfüllen.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Anforderungen an Lichtquellen für die Multiphotonenmikroskopie ist in [9] gegeben. Außer der hohen Intensität muss die Wellenlänge geeignet sein, um gängige Fluorophore anregen zu können. Eine Vielzahl von Fluorophoren, die bei der Einphotonenfluoreszenzbildgebung im Sichtbaren angeregt werden, können auch mit Wellenlängen im Bereich von 700 nm – 1100 nm durch Zweiphotonenabsorption angeregt werden [14-16]. Aufgrund der höheren Eindringtiefe von Licht mit noch längerer Wellenlänge [17-20], gibt es eine steigende Anzahl an neu entwickelten Farbstoffen, die im Bereich von 1100 nm – 1500 nm angeregt werden können [21-23]. Eine ideale Lichtquelle könnte dabei über die gesamten genannten Bereiche abstimmen.

Eine weitere Anforderung an die Lichtquelle leitet sich aus den Eigenschaften der Probe ab. Um eine zu untersuchende Probe nicht durch zu hohe thermische Belastung zu zerstören, soll der Anregungslaser gepulst sein, um kurzzeitig hohe Intensitäten auf die Probe einstrahlen zu können, gleichzeitig aber die Dauerstrichbelastung (engl. continuous wave, CW) möglichst gering zu halten. Das Produkt aus Pulslänge und Repetitionsrate, also das Verhältnis zwischen Licht an und Licht aus, wird als Tastverhältnis (engl. duty cycle, DC) bezeichnet. Dieses Tastverhältnis gibt Aufschluss darüber, wie effizient man eine Probe anregen kann, bei gleichzeitiger geringer thermischer Belastung. Bei typischen CW-Leistungen von 10 mW – 100 mW, die in der Multiphotonenbildgebung angewandt werden, und einem ebenfalls typischen Tastverhältnis von $\sim 10^{-5}$, entspricht das Pulsspitzenleistungen von 1 kW – 10 kW. Um mit dieser Lichtquelle Bildgebung machen zu können, ist eine

ausreichend hohe Repetitionsrate in der Größenordnung von 1 MHz oder mehr nötig, um bei Pixelraten von ~ 1 MHz mindestens einen Anregepuls pro Pixel bereitstellen zu können.

Mit dieser letzten Einschränkung lassen sich die wichtigsten Anforderungen zusammenfassen: a) weite spektrale Abstimmbarkeit im Nahinfrarotem, b) Spitzenleistung im Bereich von kW und c) gepulster Betrieb mit Repetitionsraten im Bereich von MHz

Um diese Anforderungen abzudecken sind bis jetzt komplexe Lasersysteme notwendig, die die Anwendung der Multiphotonenmikroskopie auf spezielle Optiklabore beschränkt. Um diese wertvolle Bildgebungsmodalität mehr Forschern zur Verfügung zu stellen, arbeiten diverse Arbeitsgruppen an einfacheren, günstigeren und robusteren Lasersystemen als Anregungslichtquelle für die nichtlineare Bildgebung. Vor allem faserbasierte Laser bieten diese Vorteile. Obwohl damit üblicherweise keine ultra-kurzen Pulse erzeugt werden können, wurden z.B. faserverstärkte Laserdioden erfolgreich für die Multiphotonenbildgebung eingesetzt [24-28]. Diese hatten bis jetzt jedoch oft eine sehr limitierte spektrale Abdeckung und waren nur für bestimmte Farbstoffe geeignet.

In dieser Arbeit wird nun eine ähnliche Lichtquelle vorgestellt, die die spektrale Limitierung der oben genannten verstärkten Laserdioden reduziert. Die faserbasierte Lichtquelle, die im Rahmen der Dissertation von Sebastian Karpf [29] und meiner Diplomarbeit [30] entwickelt wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter verbessert und näher untersucht. Es hat sich gezeigt, dass sich die gewählten Pulslängen und Verstärkungskonzepte besonders gut eignen, um die obigen Anforderungen zu erfüllen. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen näher betrachtet und ausgeführt.

Zuerst werden das Konzept und der Aufbau der Lichtquelle dargestellt. Anschließend wird beschrieben, wie man durch Vierwellenmischen (engl. four-wave mixing, FWM) und stimulierte Raman Streuung (engl. stimulated Raman scattering, SRS) in der Glasfaser zu neuen Wellenlängen kommt und abschließend wird gezeigt, dass man mit geeigneten Maßnahmen die Wellenlänge des emittierten Lichts von Puls- zu-Puls schalten kann.

Erkenntnisse, die im Zuge der Forschung an der Lichtquelle erlangt wurden, sind unter anderem in folgenden Beiträgen veröffentlicht worden:

1. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, T. Blömker, J.P. Kolb, C. Jirauschek, and R. Huber, *Pulse-to-pulse wavelength switching of a nanosecond fiber laser by four-wave mixing seeded stimulated Raman amplification*. Optics Letters, **42**(21) 2017.

2. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Blömker, and R. Huber. *Pulse-to-Pulse Wavelength Switchable Fiber Laser for Multi-Color Two-Photon Excitation Fluorescence (TPEF) Microscopy*. in *CLEO-Europe*, 2017.
3. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Blömker, and R. Huber. *Pulse-to-pulse wavelength switching of diode based fiber laser for multi-color multi-photon imaging*. in *Proc. SPIE 10083*, 2017.
4. Eibl, M., S. Karpf, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber. *Hyperspectral stimulated Raman microscopy with two fiber laser sources*. in *Proc. SPIE 9536*, 2015.
5. Eibl, M., S. Karpf, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber, *Laser sources for Time-Encoded Raman microscopy: FDML probe and multi-wavelength MOPA pump lasers for fiber-based, hyperspectral SRS microscopy*, in *MicroCor 2014*. 2014: Heidelberg, Germany.

2.1 Konzept des Anregungslasers: Master-Oscillator Power Amplifier

Die gepulste Anregungslichtquelle ist nach dem Konzept eines „Master-Oscillator Power Amplifier“ (MOPA) aufgebaut. Bei diesem Konzept wird zuerst ein Anfangssignal, das „Master-Oscillator“- oder „Seed“-Signal erzeugt. In einem zweiten Schritt im „Power Amplifier“, dem Verstärker, wird dieses Signal dann auf die gewünschten Leistungen hochverstärkt.

Dieses Konzept findet breite Anwendung in Hochleistungsfaserlasern. Im Gegensatz zu Faserlasern, die nur aus einem Oszillator bestehen, haben MOPA Faserlaser den Vorteil, dass die optischen Intensitäten besser handhabbar sind [31, 32]. Möchte man eine gleiche Ausgangsleistung einmal aus einem Faseroszillator und einmal aus einem MOPA Faserlaser bereitstellen, so muss die optische Leistung im Oszillator deutlich über der Ausgangsleistung liegen, um eine Rückkopplung für den Laserbetrieb zu gewährleisten. Dies bedeutet, dass die Leistung im ersten Fall nur soweit skaliert werden kann, bis nichtlineare Effekte im Resonator auftreten. Beim MOPA Faserlaser wird die Leistung sukzessive hochverstärkt und im optimalen Fall ist die maximale Leistung am Faserende erreicht. Durch Verwendung von Fasern mit großem Modenfelddurchmessern (engl. large mode area fiber, LMA fiber) lässt sich die Intensität in der Faser weiter reduzieren und die Grenze für das Erreichen von nichtlinearen Effekten zu höheren Leistungen verschieben. So wurden mit diesem Konzept diverse Hochleistungslaser für verschiedene Anwendungen entwickelt [33-36] oder die Leistung von Oszillatoren damit hochverstärkt [37-39].

Zusätzlich erlaubt das MOPA Konzept größtmögliche Flexibilität im Zusammenhang mit zeitlichen und spektralen Pulseigenschaften. Da die Leistungsskalierung in einem separaten Vorgang geschieht, können diese weitgehend unabhängig davon, durch das Seed-Signal vorgegeben werden. Sowohl modengekoppelte Oszillatoren, als auch aktiv modulierte Lichtquellen können dafür eingesetzt werden. Während Oszillatoren einen sehr rauscharmen Betrieb und gewisse Einstellmöglichkeiten bei einem einfachen Aufbau bieten [38, 40, 41], erhält man mit aktiver Modulation direkten Zugriff auf die Pulsform und Repetitionsrate [33, 34, 42].

Mit diesen Überlegungen wurde in dieser Arbeit eine Lichtquelle entwickelt und näher untersucht, die größtmögliche Flexibilität ermöglicht und für unterschiedliche Zwecke eingesetzt werden kann. Als Seed-Lichtquelle wird hier eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 1064 nm verwendet und das ausgegebene Licht mit einem elektrooptischen Modulator (EOM) aktiv zu kurzen Pulsen im Bereich von 50 ps – 1 ns moduliert. Die Repetitionsraten liegen typischerweise zwischen 50 kHz – 1 MHz. Diese Pulse werden mit aneinander gereihten Ytterbium dotierten

Faserverstärkern (engl. Ytterbium doped fiber amplifier, YDFA) zu Pulsen mit Spitzenleistungen von ~ 1 kW verstärkt. Der komplette Aufbau besteht aus Faserkomponenten und aus Komponenten, die im Telekombereich Anwendung finden. Dies ermöglicht es, einen einfachen, robusten und kostengünstigen Laser aufzubauen.

Im Laufe der Arbeiten an diesem Laser hat sich herausgestellt, dass nicht nur Licht bei 1064 nm generiert werden kann, sondern, dass dieses Licht durch nichtlineare Effekte in der Faser zu längeren Wellenlängen transferiert werden kann. Insgesamt kann diese Lichtquelle bei drei verschiedenen Wellenlängen, 1064 nm, 1122 nm und 1186 nm mit ähnlichen Pulsspitzenleistungen betrieben werden.

In diesem Kapitel werden nun der Aufbau der Lichtquelle und das Verschieben der Ausgangswellenlänge näher beschrieben und charakterisiert.

2.1.1 Prinzipieller Aufbau des MOPA-Lasers

Der Aufbau des Lasers ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die 1064 nm Seedlichtquelle wird vormoduliert und aus den typischerweise 20 ns langen Pulsen werden die kurzen Pulse mit einem EOM ausgeschnitten. Die resultierenden Pulse werden mit zwei kerngepumpten YDFAs und einem mantelgepumpten YDFA (engl. double clad YDFA, DC-YDFA) zu den gewünschten Leistungen hochverstärkt. Nach dem DC-YDFA werden nichtlineare Effekte in der Faser ausgenutzt um unterschiedliche Ausgangswellenlängen zu erhalten.

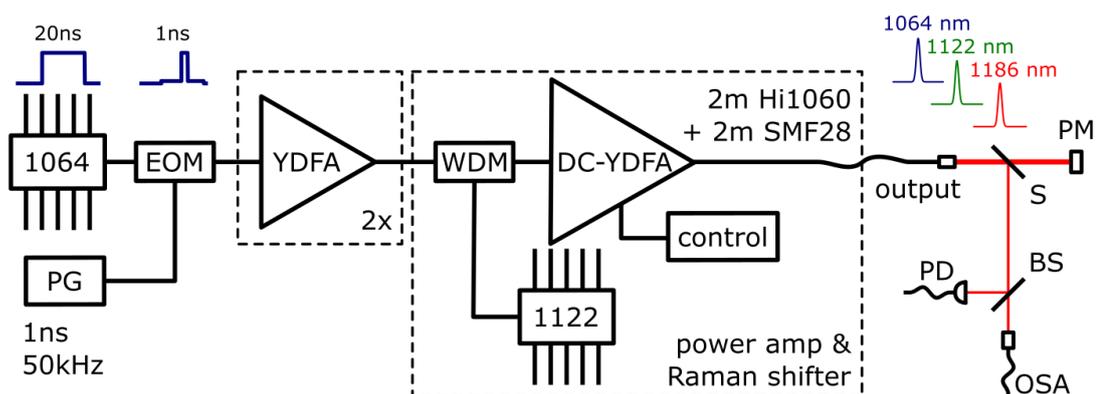


Abbildung 1: Konzept des MOPA-Lasers mit Messstrecke. Das Licht einer schmalbandigen 1064 nm Laserdiode wird aktiv zu kurzen Pulsen moduliert. Diese werden in Faserverstärkern verstärkt.

2.1.2 Seed-Puls Erzeugung

Die Erzeugung des Anfangssignals ist ein zentraler Punkt bei diesem Konzept. Hier werden die wesentlichen Eigenschaften des Ausgangspulses bestimmt: die zeitliche Form und die spektrale Form. Die zeitliche Pulsform wird durch aktive Modulation bestimmt. Das ermöglicht ein sehr flexibles Reagieren auf unterschiedliche Gegebenheiten. Vor allem das Produkt von Pulslänge und Repetitionsrate, das man auch Tastverhältnis (engl. duty-cycle, DC) nennt, ist für die nichtlineare Mikroskopie eine wichtige Kennzahl. Ein besonders kleines Tastverhältnis, also das Verhältnis zwischen Licht an und Licht aus, ermöglicht hohe Pulsleistungen, um die nichtlinearen Effekte hervorzurufen, bei gleichzeitiger geringer CW-Leistung, um die zu untersuchende Probe zu schonen. Mit dem aktiv modulierten Laser kann dabei die Pulslänge und Repetitionsrate frei eingestellt werden und somit für verschiedene Anwendungen immer mit optimalem Tastverhältnis operiert werden.

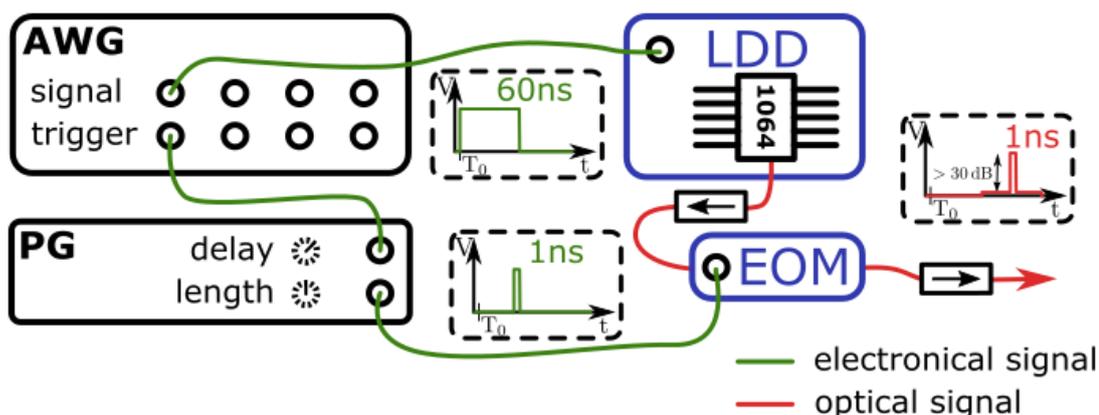


Abbildung 2: Erzeugung des Seed-Pulses. Ein Funktionsgenerator (AWG) und ein Pulsgenerator (PG) erzeugen die elektrischen Signale, die für die Modulation benötigt werden. Damit werden in der Laserdiode 60 ns lange optische Pulse erzeugt, aus denen mit einem elektrooptischen Modulator (EOM) kurze Pulse heraus moduliert werden.

Die Erzeugung des Seedsignals ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Eine Laserdiode (Lumics, LU1064M300), die mit einem Faser-Bragg-Gitter (FBG) Wellenlängen-stabilisiert ist, gibt spektral schmalbandiges Licht bei 1064 nm aus. Diese Laserdiode wird mit einem schnellen Laserdiodentreiber (engl. laser diode driver, LDD, WieserLabs, WL-LDC10D) vormoduliert und aus diesen typischerweise 20 ns – 60 ns langen Pulsen werden die gewünschten kürzeren Pulse mit einem EOM (Photline, NIR-MX-LN 10) ausgeschnitten.

Der verwendete EOM hat eine analoge 3 dB Bandbreite von 12 GHz und ermöglicht somit Pulslängen von weniger als 30 ps. Die elektrischen Pulse, die den EOM treiben, werden entweder mit einem schnellen Funktionsgenerator oder mit einem

dedizierten Pulsgenerator erzeugt. Der Funktionsgenerator (Wavepond DAx14000) kann beliebige Pulsmuster mit einer Abtastrate von 4 GS/s bei einer Auflösung von 12 Bit und einer maximalen Amplitude von ~ 300 mV erzeugen. Um damit den EOM zu treiben, wird zusätzlich ein Verstärker (Tektronix, PSPL5868) benötigt, der diese Spannungsamplitude auf die benötigten ~ 4 V hochverstärkt. Damit können Pulse bis zu 250 ps Länge erzeugt werden. Für kürzere Pulse wird ein schneller Pulsgenerator (PG, AlnairLabs EPG-210) verwendet, der bereits verstärkte elektrische Pulse von 30 ps – 250 ps erzeugen kann und somit ohne zusätzlichen Verstärker verwendet wird.

Um die Komponenten vor zurücklaufendem Licht zu schützen, ist sowohl nach der Laserdiode, als auch nach dem EOM ein optischer Isolator eingebracht. Mit einem Pumpstrom von 650 mA erhält man nach der Laserdiode Pulse mit einer Spitzenleistung von ~ 400 mW. Durch Verluste in den Isolatoren von jeweils ca. -1.5 dB, Steckverlusten von -0.5 dB und Verlusten im EOM von ca. -4.5 dB erhält man am Ausgang des ersten Isolators Pulse mit einer Spitzenleistung von ~ 80 mW (vgl. Abbildung 6).

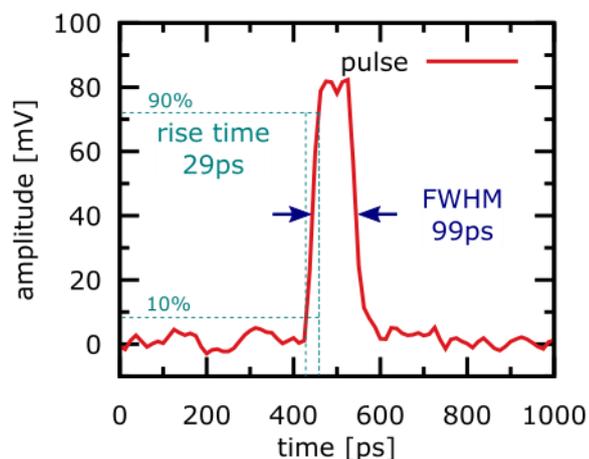


Abbildung 3: Typische Seed-Pulsform nach dem EOM. Kurze Anstiegszeiten erlauben bis zu ~ 30 ps kurze Pulse

Eine typische Pulsform der optischen Pulse nach dem EOM ist in Abbildung 3 zu sehen. Durch die hohe Bandbreite der gesamten Modulationselektronik wird eine Anstiegszeit (rise time) von weniger als 30 ps erreicht. Die rechteckige Pulsform hat eine Halbwertsbreite (engl. full width at half maximum, FWHM) von 100 ps. Diese Transiente wurde mit einer 30 GHz Photodiode (Discovery Semiconductors, DSC 20H) angeschlossen an einem 36 GHz Echtzeitoszilloskop (Lecroy, Labmaster 10-36-ZI-A) aufgenommen. Um ein stabiles Maximum-Plateau zu erhalten, hat sich ge-

zeigt, dass die Temperatur der Laserdiode angepasst werden muss. Obwohl die Laserdiode mit einem FBG stabilisiert ist, kann es vorkommen, dass zwei longitudinale Lasermoden gleichzeitig aktiv sind und eine Schwebung erzeugen, die im Bereich von mehreren GHz liegt. Da diese Schwebung eine starke Modulation der Pulsleistung nach sich ziehen würde, muss diese unterdrückt werden. Durch leichte Änderung der Temperatur des TEC (Thermoelectric Cooler) gekühlten Laserdioden Gain-Chips im Bereich von $\sim 0,1$ °C wird effektiv die Resonatorlänge geändert und man kann eine der beiden Moden für einen stabilen und rauscharmen Betrieb auswählen.

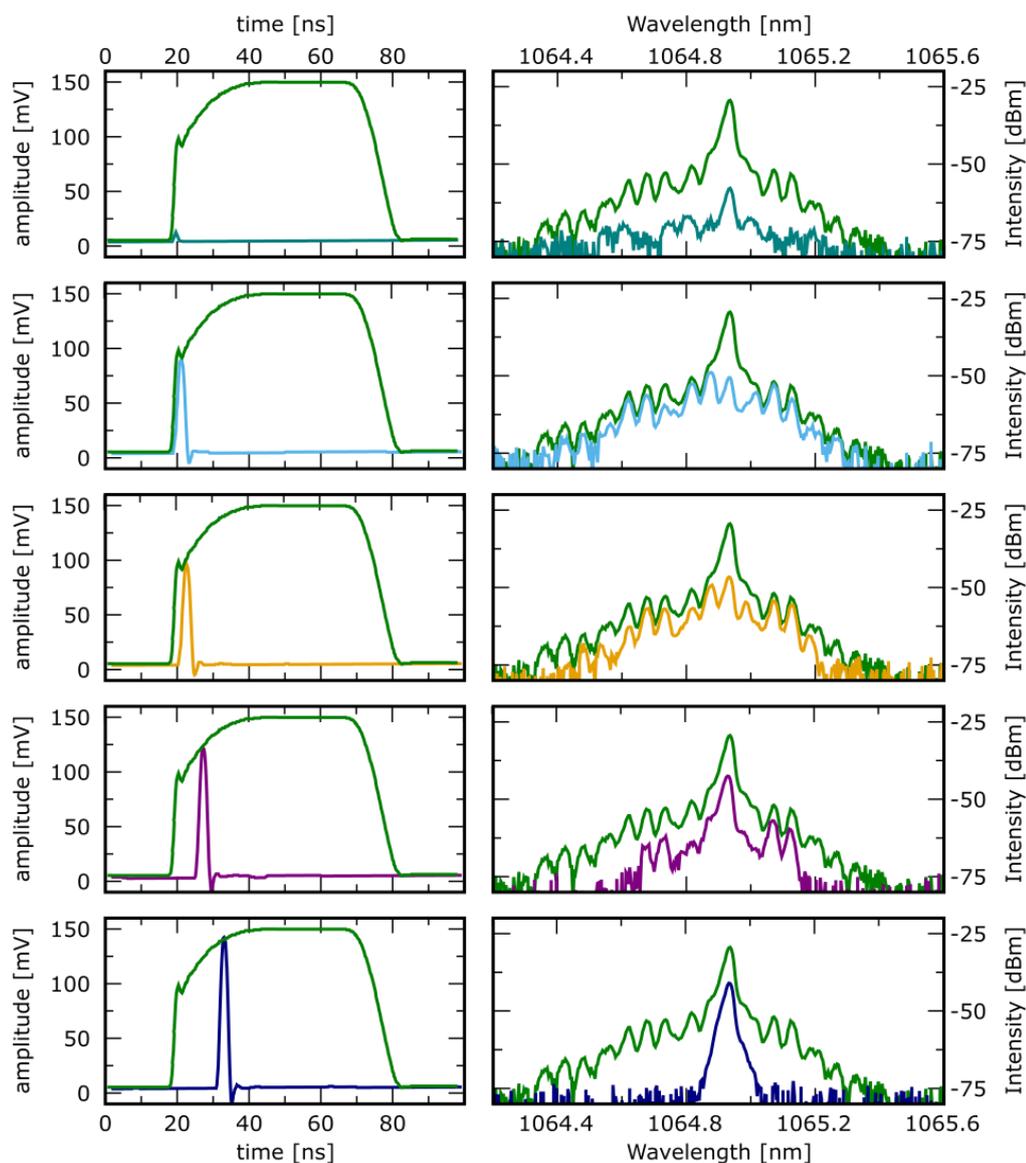


Abbildung 4: Spektrales Verhalten der modulierten 1064 nm Laserdiode. Der grüne Plot entspricht der Vormodulation. Die andersfarbigen Plots entsprechen dem herausmodulierten kurzen Puls, bei unterschiedlichen zeitlichen Abständen.

Die Vormodulation ermöglicht es, eine besonders große Unterdrückung zwischen Licht an und Licht aus zu erreichen. Da der EOM eine endliche Unterdrückung des Laserlichts von ca. 30 dB erreicht, würde bei einem CW-Betrieb der Laserdiode immer ein kleiner Teil des Lichts durch den EOM lecken und in den nachgeschalteten Verstärkerstufen hochverstärkt. Durch die Vormodulation ist die Diode die meiste Zeit aus und somit kann auch kein Licht durch den EOM lecken. Es ist jedoch zu beachten, dass für einen stationären und rauscharmen Laserbetrieb einige Umläufe im Resonator nötig sind, um ausreichend Feedback für die stimulierte Emission zu haben. Der kurze Puls soll also erst ausgeschnitten werden, wenn die Laserdiode im stabilen Bereich operiert. Abbildung 4 zeigt das Verhalten der modulierten Laserdiode. Links abgebildet das zeitliche Verhalten, rechts abgebildet das spektrale Verhalten, jeweils nach dem EOM. Die Transiente wurde mit einem 1 GHz Echtzeitszilloskop (Tektronix, DPO7104C) und einer 1 GHz Photodiode (MenloSystems) gemessen, die Spektren mit einem optischen Spektrum Analysator (OSA, Yokogawa AQ6370). Die Laserdiode wurde mit 60 ns Pulsbreite vormoduliert (Abbildung 4, dunkelgrüne Linie). Am zeitlichen Verlauf ist erkennbar, dass die maximale Leistung nach ca. 20 ns erreicht wird. Im Spektrum sind ein Maximum bei einer Wellenlänge von 1064.9 nm und ein breiter Untergrund daneben erkennbar. Um das spektrale Verhalten zu untersuchen, wurden mit dem EOM 1 ns breite Pulse an unterschiedlichen Positionen aus dem vormoduliertem Bereich ausgeschnitten. Von oben nach unten erkennt man, dass der spektral breite Untergrund aus den ersten Nanosekunden des Pulses stammt. Nach ca. 15 ns hat sich ein stabiler Laserbetrieb ausgebildet und die kurzen Pulse können ausgeschnitten werden, um in den nachfolgenden Verstärkerstufen hochverstärkt zu werden.

2.2 Verstärkung der 1064 nm Pulse

Die Seed-Pulse mit Spitzenleistungen von einigen 10 mW bis zu knapp 100 mW werden in einer mehrstufigen Verstärkeranordnung zu Spitzenleistungen von ~ 1 kW hochverstärkt. Die Verstärkerkaskade besteht aus zwei kerngepumpten YDFAs und einem mantelgepumpten YDFA (DC-YDFA). Die einzelnen Stufen werden im Folgenden beschrieben.

2.2.1 Kerngepumpter YDFA

Die zentrale Komponente eines YDFAs ist die aktive, kerngepumpte Ytterbium-dotierte Faser, die als Gainmaterial dient. Diese Faser wird optisch mit einer Laserdiode gepumpt und somit in einen angeregten Zustand versetzt. Das Seed-Licht räumt die angeregten Zustände durch stimulierte Emission ab und wird dadurch verstärkt [32, 43].

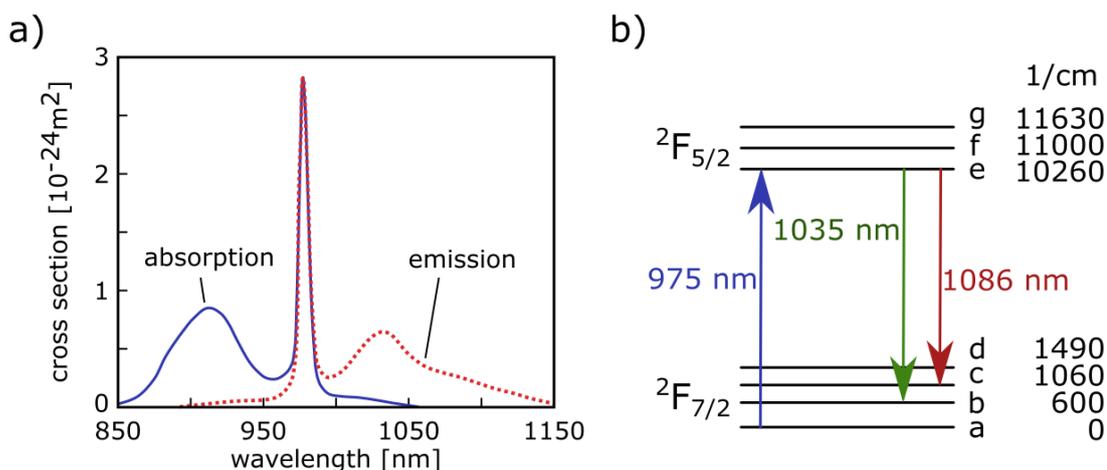


Abbildung 5: Absorptions- und Emissionscharakteristik von Ytterbium. a) Absorptions- und Emissionsstreuquerschnitt, b) vereinfachtes Termschema, beides nach [43].

In Abbildung 5 sind das Absorptions- und Emissionsspektrum (vgl. a)) und ein vereinfachtes Termschema (vgl. b)) von Ytterbium-Atomen in einer Germanosilikatfaser dargestellt (beides reproduziert nach [43]). Die Ytterbium dotierte Faser wird beim Absorptionsmaximum von 975 nm gepumpt und stimulierte Emission durch den Seed-Laser bei 1064 nm induziert. Anhand des Termschemas kann man sehen, dass der Laserübergang für 1064 nm hauptsächlich in die Niveaus c und b stattfinden kann. Da das Licht bei Wellenlängen länger als 1050 nm kaum reabsorbiert wird, verhält sich der Laser wie ein quasi Vier-Niveau Laser [43]. Diese Eigenschaft ermöglicht einen sehr effizienten Laserbetrieb.

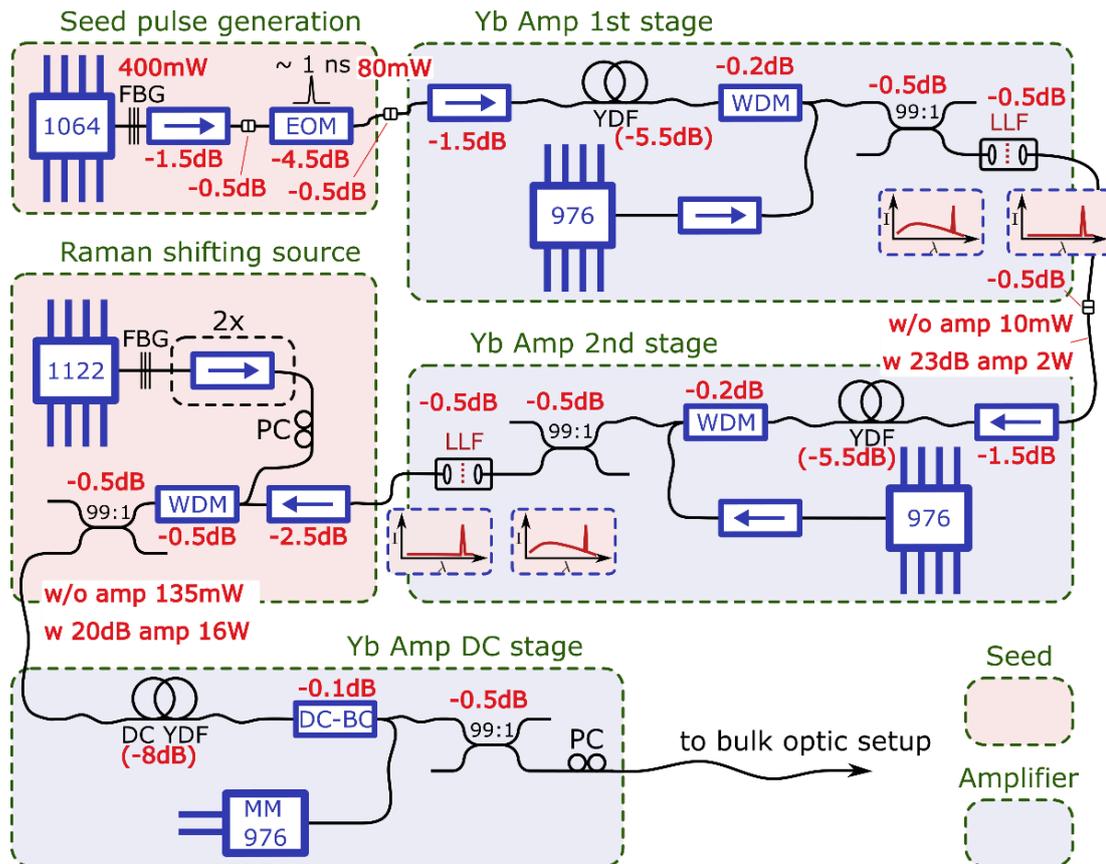


Abbildung 6: Aufbau des 1064 nm Lasers mit Verstärker. Rote Bereiche markieren Anregungslichtquellen für stimulierte Emission. Blaue Bereiche markieren die Verstärker. In roter Farbe eingezeichnet sind wichtige Leistungs- und Verlustwerte.

Die beiden ersten Verstärkerstufen sind identisch aufgebaut und eine schematische Darstellung ist in Abbildung 6 gezeigt. Im Folgenden wird eine dieser Verstärkerstufen näher beschrieben. Als Gainmaterial bzw. Lasermedium dient eine kerngepumpte Ytterbium-Faser (Nufern, SM-YSF-HI). Diese Faser ist von den geometrischen Eigenschaften darauf ausgelegt mit Hi1060 Faser verspleisst zu werden, welche bei vielen Komponenten zum Einsatz kommt. Das Pumplicht wird mit einem Wellenlängenmultiplexer (engl. wavelength division multiplexer, WDM) in rückwärtige Richtung in die Ytterbium-Faser eingekoppelt. Als Pumplichtquelle dient eine 975 nm Single-Mode Laserdiode (Lumics, LU0975M500), die Pumpleistungen bis zu 500 mW zur Verfügung stellen kann. Um die Pumpdiode vor intensiven Pulsen zu schützen, die durch die endliche Unterdrückung im WDM in den Pumparm lecken können, wurde vor der Laserdiode ein spektraler Filter installiert, der nur das Pumplicht passieren lässt. Außerdem schützt ein weiterer Isolator Komponenten vor der Verstärkerstufe vor zurücklaufendem Licht. Um die Betriebsparameter überprüfen zu können, wurde nach dem WDM ein 99:1 Koppler eingebaut, dessen 1 % Ausgang als Monitorausgang dient. Am 99 % Ausgang des Kopplers ist ein fasergekoppelter optischer Bandpassfilter installiert, der Licht nur in einem 2 nm

breiten Band um 1064 nm durchlässt und den breiten ASE-Untergrund um 1030 nm von Ytterbium herausfiltert.

Ein zentraler Punkt beim Auslegen der Verstärkerstufe ist die Länge der verwendeten Ytterbium-Faser. Dabei müssen zwei Effekte gegeneinander abgewogen werden. Zum einen kann eine lange aktive Faser mehr Pumplicht speichern und liefert somit eine höhere Verstärkung. Zum anderen steigt durch eine längere aktive Faser jedoch der Anteil von spontan emittiertem Licht (engl. amplified stimulated emission, ASE), vornehmlich um das Gain-Maximum von Ytterbium bei 1030 nm. Wird dieser ASE-Anteil zu groß, kann dies zu einer Laseroperation bei 1030 nm führen und die Verstärkung bei den gewünschten Wellenlängen verringern. Durch eine sogenannte „cut-back-method“ kann die Länge unter Berücksichtigung beider Effekte optimiert werden. In diesem Fall wurden Faserlängen von 0,5 m, 0,9 m, 1,5 m, 1,8 m und 2,5 m untersucht und eine optimale Verstärkung ohne problematischem ASE Untergrund ergab sich bei einer Faserlänge von 1,8 m. Bei einer Pumpleistung von jeweils 400 mW ergab sich ein Anstieg der Ausgangsleistung um ~ 23 dB für die erste Verstärkerstufe und für die zweite Verstärkerstufe inklusive Hochleistungsisolator ein Anstieg um ~ 20 dB. Um die effektive Verstärkung des Eingangslichts angeben zu können, müssen jedoch die Verluste der eingebrachten Komponenten berücksichtigt werden.

Da der Verstärkungsfaktor eine wichtige Kenngröße ist, wird diese im Folgenden genauer analysiert. In Abbildung 6 sind in roter Farbe Leistungen an bestimmten Stellen im Laser und die Verluste für die wesentlichen Komponenten angegeben. Die Verlustangaben bei den Ytterbium-Fasern beziehen sich dabei auf die Restabsorption von Ytterbium bei 1064 nm, wenn die Faser nicht gepumpt wird. Die vormodierte Seed-Laserdiode gibt Pulsspitzenleistungen von 400 mW aus. Durch Verluste von -1,5 dB für einen Isolator, -4,5 dB für den EOM und zwei Steckverbindungen mit Verlusten von jeweils ca. -0,5 dB, liegen an der ersten Verstärkerstufe ca. 80 mW an. Die Komponenten der ersten Verstärkerstufe schwächen diese Leistung weiter ab und nach der ersten Stufe liegen noch 10 mW Pulsspitzenleistung an, wenn der Verstärker ausgeschaltet ist. Der oben angegebene Anstieg der Ausgangsspitzenleistung bezieht sich auf diesen Ausgangswert von 10 mW. Um den effektiven Verstärkungsfaktor zu berechnen, wird jedoch die am Eingang anliegende Leistung mit der maximalen Ausgangsleistung verglichen. Die effektive Verstärkung ergibt sich mit einer Eingangsspitzenleistung von 80 mW und einer Ausgangsleistung von 2 W zu 14 dB. Für die zweite Verstärkerstufe ergibt sich eine noch geringere effektive Verstärkung von 9 dB, weil zu dieser Stufe noch ein Hochleistungsisolator mit mehr Verlusten und ein zusätzlicher WDM zählen. Insgesamt ergibt sich somit für die ersten beiden kerngepumpten Verstärkerstufen eine Verstärkung von 23 dB und man

erhält am Ausgang der zweiten Stufe Pulsspitzenleistungen von etwas weniger als 20 W. Vergleicht man diese Gesamtverstärkung mit Literaturwerten ergibt sich eine gute Übereinstimmung. So berichten [44] von 12 dB, [35] von 17 dB und [34] von 13 dB für eine ähnlich aufgebaute einstufige kerngepumpte Verstärkerstufe ohne nachgelagerten Isolator.

An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass für andere Konfigurationen deutlich höhere Verstärkungsfaktoren möglich sind. So wird in [32] eine maximale Verstärkung von 18 dB/m für Licht bei 1030 nm und ähnlichen Faserparametern angegeben und in [45] eine Verstärkung von ~ 20 dB bei 1060 nm für eine kerngepumpte Verstärkerstufe. In beiden Fällen handelt es sich jedoch um CW-Laser, bei denen der Anstieg von ASE stärker unterdrückt wird, als bei gepulsten Lasern.

2.2.2 Mantelgepumpter YDFA

Die beiden kerngepumpten YDFAs dienen in diesem Aufbau als Vorverstärker für einen mantelgepumpten Leistungsverstärker (DC-YDFA). Die Verwendung von mantelgepumpten, sogenannten double cladding (DC), Fasern ermöglicht es, Hochleistungs-Multimode Laserdioden zum Pumpen der Yb-Faser zu verwenden um die Leistungslimitierungen von Monomode-Laserdioden zu umgehen. Aktuell am Markt verfügbare Monomode-Laserdioden stellen bis zu 1 W optische Pumpleistung bei 976 nm zur Verfügung. Mit Multimode Laserdioden können mehr als 10 W bereitgestellt werden.

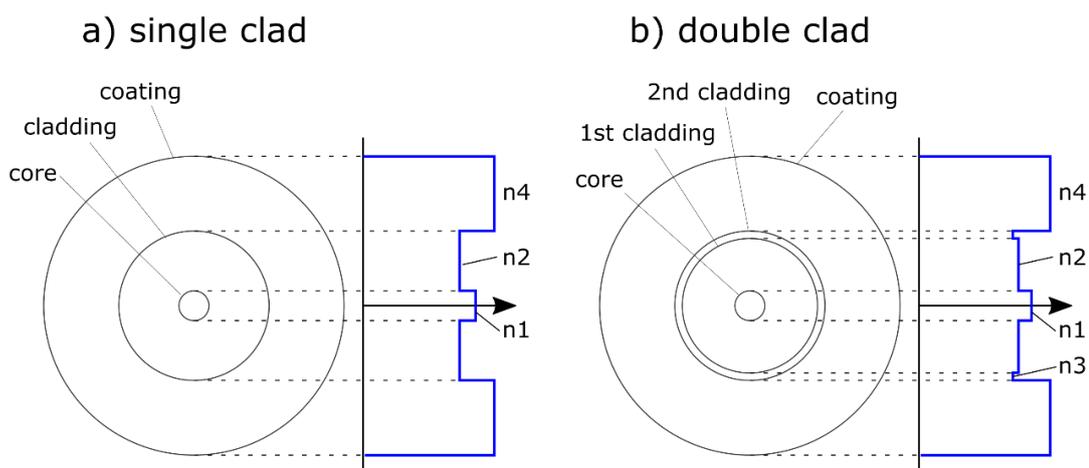


Abbildung 7: Schematischer Aufbau von SMF (a) und double clad Fasern (b).

Die DC-Faser ist dabei etwas anders aufgebaut als normale Monomodefasern (engl. single mode fiber, SMF) und in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Der Kern einer SMF ist mit einem Mantel umgeben, der einen niedrigeren Brechungsindex, n_2 , als der Kern, n_1 , hat, um Totalreflexion zu ermöglichen. Um diese beiden Bereiche aus Glas zu schützen, ist außen ein Kunststoff angebracht, der typischerweise einen größeren Brechungsindex, n_4 , als der Mantel hat. Licht wird somit nicht im Mantel geleitet, weil die Totalreflexionsbedingung nicht erfüllt ist. Im Gegensatz dazu hat eine DC-Faser entweder noch eine dritte Schicht mit einem niedrigeren Brechungsindex, n_3 , oder eine Kunststoffummantelung mit einem niedrigen Brechungsindex, um Licht auch noch im Mantel propagieren lassen zu können. Für die DC-YDF ergibt sich dann folgender Aufbau. Der Kern ist mit Ytterbium-Atomen dotiert und hat passende Eigenschaften, um das Signallicht bei 1064 nm monomodig propagieren zu lassen. Der Mantel ist undotiert und ermöglicht die Propagation von multimodigem Pumplicht. Daraus ergeben sich zwei große Vorteile. Erstens können günstigere multimodige Pumplaser mit mehr Leistung zum Pumpen verwendet werden. Zweitens kann die Signalleistung in der Faser erhöht werden, weil der Kern nicht gleichzeitig einer hohen Pumpleistung und einer hohen Signalleistung standhalten muss. Jedoch muss beachtet werden, dass der Modenüberlapp zwischen dem multimodigem Pumplicht und dem dotierten Kern deutlich geringer ist, als bei kerngepumpten Fasern. Dadurch müssen längere Fasern verwendet werden, um eine ähnlich hohe Absorption und somit Verstärkung zu erreichen. Außerdem gibt es unterschiedliche Verfahren, um die verschiedenen transversalen Moden in der Faser ständig durchzumischen. Einerseits ist dies mit speziellen Fasergeometrien [46] möglich und andererseits kann eine unsymmetrische Wicklung der Faser selbiges bewirken [31, 47].

Die hier verwendete Faser (Nufern, LMA-YDF-10/125-9M) hat einen Kerndurchmesser von 11 μm und einen Manteldurchmesser von 125 μm . Der zweite Mantel ist konzentrisch um den Kern angeordnet und die Faser in einer Nierenform aufgewickelt. Die geometrischen Eigenschaften und die verwendeten Materialien erlauben es, die DC-YDF mit Hi1060- und SMF28-Faser zu verspleissen. Jedoch unterscheiden sich die numerische Apertur (NA) und der Modenfelddurchmesser (MFD) der hier verwendeten Fasern. Es muss deshalb mit Verlusten an den Spleissstellen gerechnet werden. Eine Anpassung der MFD ist mit speziell erhältlichen Modenfeldadaptern (MFA) möglich.

Der prinzipielle Aufbau des DC-YDFA ist den kerngepumpten Verstärkern ähnlich und in Abbildung 6 mitdargestellt. Die DC-YDF ist direkt mit dem Ausgang der zweiten Stufe verspleisst. Eine Länge der DC-YDF von ~ 4 m hat sich für unsere An-

wendungen als geeignet erwiesen. Diese Faser wurde auf der anderen Seite mit einem $(2+1) \times 1$ Strahlkombinierer (engl. beam combiner, DC-BC) verspleisst. Dieser ermöglicht es zwei multimodige Pumplaser in den Mantel der DC-YDF einzukoppeln und schleift das Signal im Kern durch. In diesem Fall reicht die Pumpleistung einer einzelnen Laserdiode mit einer maximalen Leistung von 9 W (Lumics, LU0975T090) aus, um die nötige Verstärkung zu erreichen. An den Signal-Ausgang des DC-BC wurde eine Kombination von ca. 2 m SMF28 und 2 m Hi1060 Faser gespleisst, an die ein Faserkonnektor angebracht ist, an dem das Licht ausgekoppelt wird.

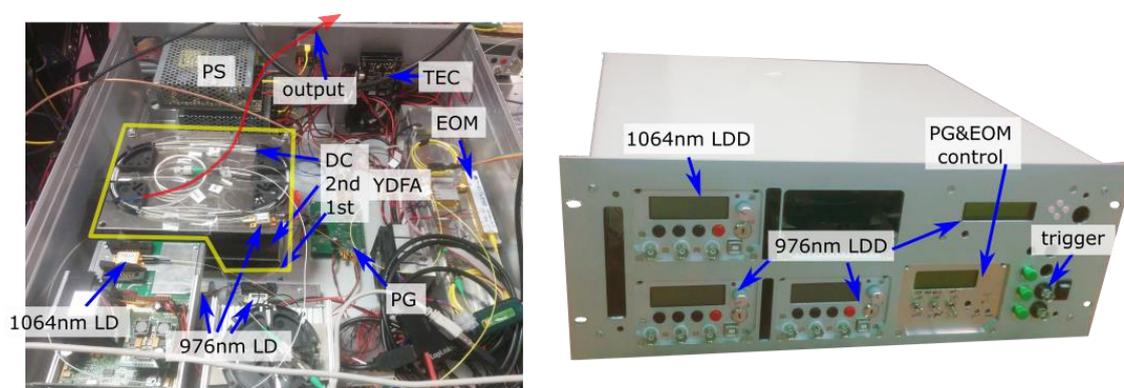


Abbildung 8: Foto des Faser MOPA-Lasers. Links: einzelne Komponenten im Inneren. Rechts: Außenansicht des in einen 19" Rackeinschub integrierten Lasers.

Der gesamte Laseraufbau ist in Abbildung 8 zu sehen. Alle Komponenten finden in einem 4 HE hohen 19" Rackeinschub Platz. Auf der linken Seite ist eine Innensicht des Einschubs zu sehen. Die wichtigsten Komponenten sind beschriftet. Neben den oben erwähnten Komponenten sind hier zusätzlich noch die Netzteile (engl. power supply, PS) aufgeführt. Hervorzuheben ist der gelb markierte Bereich. Nur in diesem ca. $15 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ großen Bereich befinden sich die Faserverstärker. Das restliche Volumen des Rackeinschubs ist hauptsächlich mit Elektronikkomponenten ausgefüllt. Mit entsprechend entwickelter Elektronik und einer noch kompakteren Bauweise, wäre sogar eine weitere Reduzierung des Platzbedarfs möglich. Auf der rechten Seite von Abbildung 8 sieht man die Vorderansicht des Lasers. Dort kann man an verschiedenen LDD die Ströme an den Laserdioden einstellen. Außerdem gibt es eine Steuereinheit für den Pulsgenerator und den EOM. Die meisten Einstellungen bleiben dabei jedoch im Normalbetrieb gleich. Das heißt, auch hier könnte man den Platzbedarf für Bedienelemente weiter reduzieren. Lediglich der Trigger-Eingang, ein Ein-Aus-Schalter und eine Steuerung der Ausgangsleistung wären bei einem weiter optimierten Laser nötig. Insgesamt erkennt man auf den Bil-

den, den sehr kompakten Aufbau des Lasers. In diesem Rack sind alle Komponenten verbaut, die für den Laserbetrieb nötig sind. Die Anforderung einer kompakten Lichtquelle ist somit erfüllt.

2.3 Charakterisierung der 1064 nm Pulse

Die Seedpulse werden mit den beschriebenen Verstärkern zu hohen Spitzenleistungen hochverstärkt. Die resultierenden Pulse werden in diesem Kapitel charakterisiert. Wichtig für die weiteren Experimente ist die zeitliche und spektrale Form der Pulse nach dem Faserausgang. Um diese charakterisieren zu können, wurde eine Messstrecke aufgebaut, in der man die hohen Leistungen definiert verringern kann, um die verwendeten Messgeräte nicht zu zerstören. Eine Schemazeichnung dieses Aufbaus ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Licht kommt aus einem Faserkonnektor und wird kollimiert auf einen Spiegel mit polierter Rückfläche gelenkt. Die Rückfläche ist dabei die erste Oberfläche, auf die das Licht fällt. Die Glasoberfläche, die unter einem kleinen Winkel zum Strahl geneigt ist, reflektiert breitbandig 4 % der Leistung. Das restliche Licht wird von der beschichteten Spiegelfläche reflektiert und auf einen thermischen Messkopf gelenkt, um die CW-Leistung zu messen. Der 4 % Anteil wird über einen abgeschnittenen Spiegel abgelenkt und mit Graufiltern (engl. neutral density filter, ND-filter) wird die Leistung nochmals abgeschwächt. Ein spektral breitbandiger Strahlteiler lenkt einen Teil des Lichts in Richtung einer schnellen Photodiode ab und den anderen Teil in Richtung eines optischen Spektralanalysators (engl. optical spectrum analyser, OSA). Mit diesen drei Messgeräten können die wichtigsten Eigenschaften, CW-Leistung, Spektrum und instantane Pulsform, vermessen werden. Für die hier dargestellten Messungen wurde die Pulsdauer auf 500 ps und die Repetitionsrate auf 400 kHz eingestellt.

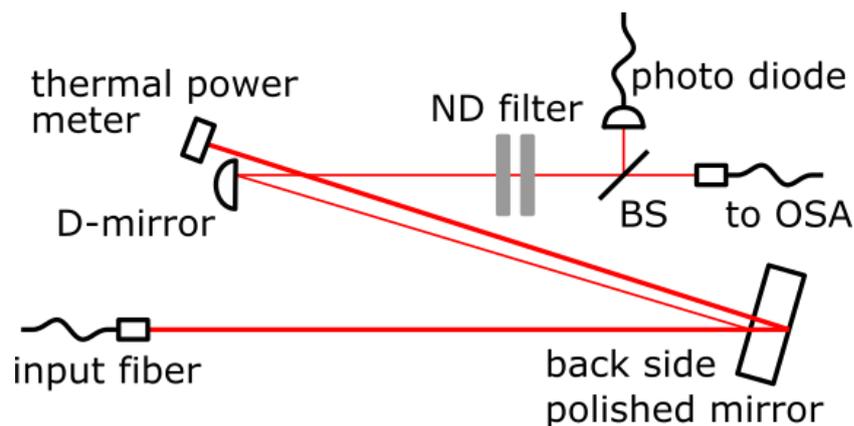


Abbildung 9: Messaufbau für die Charakterisierung der Laserpulse. Die Pulse können gleichzeitig mit einer Photodiode zeitlich und mit einem optischen Spektrum-Analysator (OSA) spektral untersucht werden.

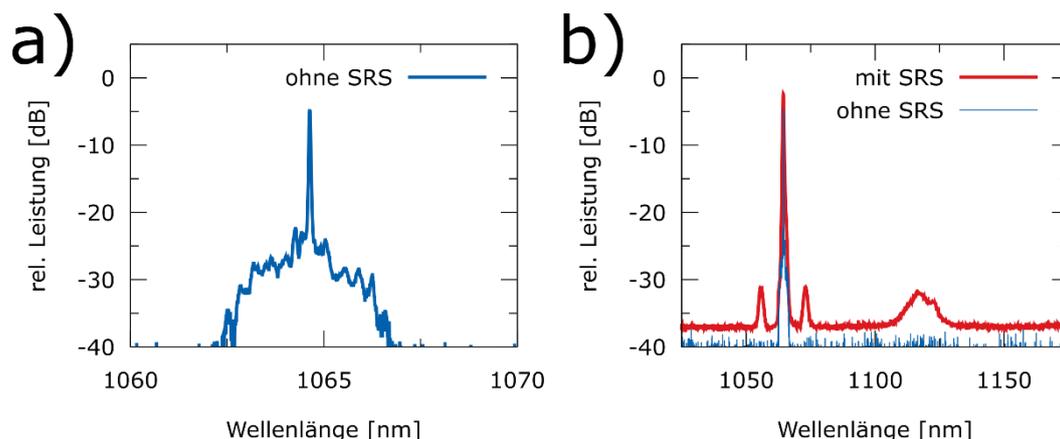


Abbildung 10: Spektrales Verhalten der 1064 nm Pulse am Faserausgang. a) Ausgangsleistung unterhalb des Raman Grenzwertes b) Ausgangsleistung über dem Raman Grenzwert.

Abbildung 10 zeigt dabei zwei typische Spektren am Faserausgang der letzten Verstärkerstufe. a) zeigt das Spektrum des Lasers bei einer Ausgangsspitzenleistung von 610 W und b) das Spektrum bei einer Ausgangsspitzenleistung von 720 W. Anhand dieser Spektren können wichtige Eigenschaften des Lasers bestimmt werden. In erster Abbildung erkennt man eine äußerst schmalbandige Spitze über einem ~ 3 nm breiten Untergrundsockel. Der Sockel resultiert vom ASE Untergrund der YDFA, der durch die eingebauten Bandpassfilter noch transmittiert wird. Mittig in diesem Untergrund sieht man eine schmale spektrale Komponente. Diese Komponente stellt den verstärkten Puls dar und weist eine Halbwertsbreite von 40 pm auf.

Erhöht man die Pumpleistung der letzten Verstärkerstufe weiter, so verändert sich das Ausgabespektrum des Lasers aufgrund nichtlinearer Effekte in der Glasfaser. Mit einer Steigerung der Ausgangsleistung von etwas weniger als 20 % erhält man das in Abbildung 10 b) in Rot dargestellte Spektrum. Zum Vergleich ist das Spektrum mit 610 W Spitzenleistung in blau aufgetragen. Dort können zwei wichtige limitierende Faktoren für die maximale Ausgangsspitzenleistung identifiziert werden. Die beiden schmalbandigen Komponenten, symmetrisch um den 1064 nm Puls angeordnet, werden durch „modulation instability“ hervorgerufen [48]. Der breitbandige Bereich um 1120 nm wird durch stimulierte Raman Streuung des intensiven Pumplichts in der Glasfaser hervorgerufen [49]. Diverse weitere limitierende Effekte für die maximale Ausgangsleistung in Faserlasern können bei unterschiedlichen Pulsparametern auftreten. Einen guten Überblick über diese Effekte liefern zum Beispiel Richardson et al. [50] oder Agrawal [51]. Für die in dieser Arbeit gewählten Pulsparameter hat sich aber vor allem SRS als Limitierung herausgestellt. Das bedeutet, dass die maximale Spitzenleistung des Lasers dadurch begrenzt wird, dass ab einem Schwellwert von ~ 650 W Energie aus dem gewünschten spektralen Bereich um 1064 nm zu längeren Wellenlängen übertragen wird und die Leistung

bei 1064 nm nicht mehr weiter ansteigt. Dabei ist SRS ein exponentiell anwachsender Effekt und schon ein geringer Leistungszuwachs führt zu einer enormen Verstärkung des Effekts.

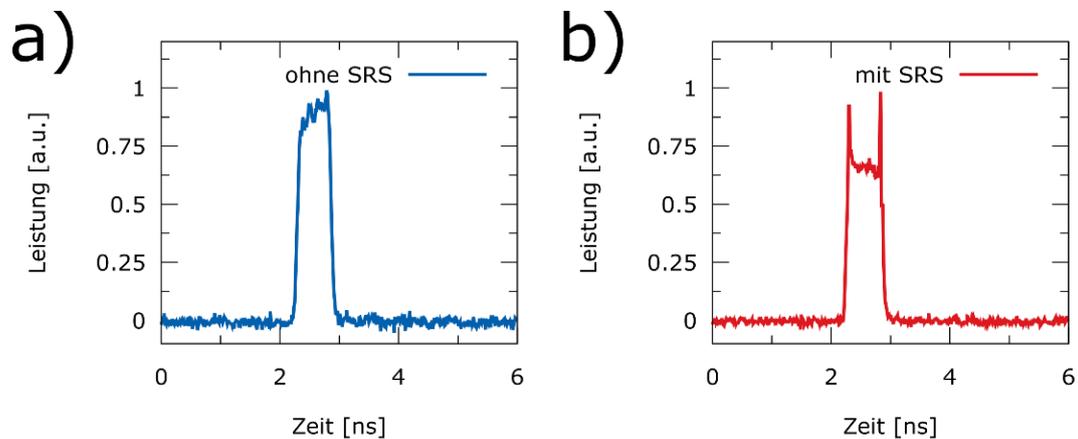


Abbildung 11: Zeitaufgelöstes Verhalten der 1064 nm Pulse am Faserausgang. a) Ausgangsleistung unterhalb des Raman Grenzwertes b) Ausgangsleistung über dem Raman Grenzwert.

Dieses Verhalten ist in Abbildung 11 zu sehen. Beide Graphen zeigen den 1064 nm Puls zeitlich aufgelöst. Dabei wurde ein 10 nm breiter Bandpassfilter nach der Abschwächung in den Strahlengang gestellt, um nur die gewünschte Komponente um 1064 nm zu detektieren. In Abbildung 11 a) sieht man die gewünschte rechteckige Pulsform mit einer Breite von ~ 560 ps. Dieser Graph korrespondiert mit dem Graphen a) aus Abbildung 10, bei dem der Schwellwert für SRS noch nicht überschritten wurde. Rechts davon, in Abbildung 11 b), ist das zeitliche Verhalten des Pulses zu sehen, wenn der Schwellwert für SRS überschritten wird. Man erkennt, dass in der Mitte die Leistung des Pulses einbricht. Die steigenden und fallenden Flanken bleiben dabei teilweise erhalten, weil dort die Leistung noch ansteigt und somit bis zu einem gewissen Punkt der Raman Grenzwert noch nicht erreicht wurde.

Somit können mit der hier beschriebenen Konfiguration unterschiedliche Pulsformen mit sehr schmalbandigem (40 pm) Licht bei 1064 nm und Pulsspitzenleistungen von etwas weniger als 1 kW erzeugt werden. Die nichtlinearen Effekte, die die maximale Leistung bei dieser spektralen Komponente limitieren, können jedoch auch ausgenutzt werden, um neue spektrale Komponenten zu erhalten. Im nächsten Kapitel wird ein solches Verfahren beschrieben.

2.4 Wellenlängenverschiebung mittels SRS und FWM

Die oben beschriebene Lichtquelle stellt 30 ps – 1 ns lange Pulse mit Spitzenleistungen von ~ 1 kW bei 1064 nm zur Verfügung. Die Pulsparameter wie Pulslänge, Repetitionsrate und spektrale Breite sind für viele Anwendungen optimal geeignet. Eine große Limitierung ist jedoch die Beschränkung auf eine einzige Wellenlänge. In diesem Unterkapitel wird nun eine Methode vorgestellt, wie man andere Ausgabewellenlängen erreichen kann.

2.4.1 Theorie und Grundlagen

Faserlaser bieten viele Vorteile, die in vielen Anwendungen von großer Bedeutung sind. Dazu zählen die bereits erwähnten Eigenschaften, wie Leistungsskalierbarkeit, monomodiges Strahlprofil und Robustheit. Mit aktiver Modulation kann sogar die Repetitionsrate und die Pulslänge frei eingestellt werden. Trotz dieser vielen Vorteile, gibt es aber noch zahlreiche Anwendungen, in denen Faserlaser bis jetzt nicht verwendet werden konnten, weil diese einen sehr bedeutenden Nachteil haben: Hochleistungsfaserlaser sind auf geeignete Verstärkungsmaterialien angewiesen und diese sind nur in einem begrenzten spektralen Bereich verfügbar.

Die beiden prominentesten Verstärkungsmedien für Faserverstärker sind Ytterbium und Erbium dotierte Fasern. Ytterbium deckt dabei einen spektralen Bereich von etwa 1000 nm bis 1150 nm ab und Erbium einen Bereich von 1500 nm bis 1600 nm. Für die Regionen außerhalb dieser Bereiche ist eine direkte Verstärkung kaum möglich. Jedoch wären diese Bereiche besonders interessant für die biomedizinische Bildgebung, weil man dort die größte Eindringtiefe erreichen kann [9, 16, 18, 19, 52-54].

Deshalb wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um Licht von den Verstärkerregionen um 1050 nm und 1550 nm zu anderen spektralen Bereichen zu verschieben. Ohne einen Überblick über alle möglichen Verfahren zu geben, wird hier kurz auf zwei wichtige Mechanismen eingegangen. Eine dieser Methoden ist stimulierte Raman Streuung (SRS) in der Glasfaser, um mit einem intensiven Pumplicht Licht bei längeren Wellenlängen zu erhalten [49, 55, 56]. Man kann dies als Raman-Laser implementieren, bei dem für einzelne oder mehrere Wellenlängen ein Resonator gebaut wird [57-60] oder als Raman Verstärker, bei dem ein schwaches Signal mit einer starken Pumpe kombiniert wird und durch SRS verstärkt wird [61-64]. Letzteres Konzept wird dabei unter anderem auch in der Telekommunikation benutzt, um die Verluste des Signals bei sehr langen Übertragungsstrecken auszugleichen [65].

Neben SRS können neue Wellenlängen auch mit parametrischer Verstärkung über Vier-Wellen-Mischen (engl. four-wave mixing, FWM) erreicht werden. Da für diesen Prozess Phasenanpassung erfüllt werden muss, wird für eine effiziente Erzeugung neuer spektraler Komponenten eine speziell hergestellte Faser benötigt. Diese sogenannten photonischen Kristallfasern (engl. photonic crystal fiber, PCF) können so entwickelt werden, dass sie Phasenanpassung für bestimmte Wellenlängenkombinationen ermöglichen. Damit sind verschiedene optisch parametrische Verstärker [37, 66-69] und Oszillatoren [39, 41, 70, 71] realisiert worden. Da diese Fasern teuer und nicht einfach handzuhaben sind, wäre eine Wellenlängenkonversion in Standard-Monomodenfasern wünschenswert. Im Bereich der normalen Dispersion, der für diese Fasern vorliegt, ist eine effiziente Phasenanpassung jedoch nicht möglich [72, 73].

Die Kombination aus beiden Effekten könnte jedoch den gewünschten Effekt bieten. Das Zusammenspiel zwischen SRS und FWM in monomodigen Glasfasern wurde bereits eingehend in der Literatur studiert [74-76]. FWM kann zwar in diesen Fasern nicht effizient stattfinden, über eine kurze Wegstrecke, der Kohärenzlänge für diesen Vorgang, werden jedoch neue spektrale Komponenten erzeugt. Liegen diese nun im Bereich der Ramanverstärkung, können diese hochverstärkt werden.

Jedoch konnte noch nicht gezeigt werden, dass diese Effekte kombiniert genutzt werden können, um spektral schmalbandiges Licht kaskadiert zu verstärken. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. So konnten die intensiven Pulse bei 1064 nm mit SRS zu 1122 nm und durch die Kombination von SRS und FWM zu 1186 nm verschoben werden. Im nächsten Abschnitt wird beschrieben, welche Parameterwahl eine besonders gute Wellenlängenverschiebung zu den längeren Wellenlängen ergibt. Anschließend wird durch qualitative Überlegungen und einer numerischen Simulation bestätigt, dass die Kombination aus SRS und FWM für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Abschließend wird gezeigt, dass die instantane Natur der beiden Effekte es erlaubt, die Wellenlängen von Puls zu Puls zu verändern.

2.4.2 Parameteroptimierung für die Erzeugung verschiedener Wellenlängen durch SRS und FWM

Der prinzipielle Aufbau der Lichtquelle wurde bereits in Abbildung 1 dargestellt und im vorherigen Kapitel beschrieben. Für die folgenden Messungen wurde die Pulslänge auf 1 ns und die Repetitionsrate auf 50 kHz eingestellt. Neben den zeitlichen Einstellungen der Pulse, die durch Vormodulation und Modulation durch das EOM gegeben sind, können im Aufbau noch weitere Parameter verändert werden. Zum

einen lässt sich die Leistung der 1064 nm Pulse über zwei unterschiedliche Mechanismen verändern. Einmal kann der Verstärkungsfaktor der YDFAs über die zugeführte Pumpleistung verändert werden. Außerdem lässt sich die Ausgabeleistung variieren, indem man die Seedleistung durch Modulation der 1064 nm Laserdiode verändert. Zum anderen kann durch Zugabe eines weiteren Seedlaser für SRS in der Glasfaser die Effizienz der Ramanstreuung in der Faser erhöht werden. Mit diesen beiden Methoden, Skalierung der 1064 nm Pulsleistung und Aktivierung eines Raman-Seed Lasers, werden im Folgenden die Leistungen für verschiedenen Ausgabewellenlängen optimiert.

Um die Leistung bei einer Wellenlänge von 1064 nm zu maximieren, wird die Leistung soweit erhöht, bis nichtlineare Effekte, vor allem SRS, die Leistung zu längeren Wellenlängen verschieben. In Abbildung 12 a) ist ein Spektrum für diese Einstellung zu sehen. Neben der schmalbandigen Linie bei 1064 nm ist der breitbandige spontane Raman Bereich um 1120 nm erkennbar. Die spektrale Breite der 1064 nm Komponente wurde zu 38 pm bestimmt und ca. 97 % der gesamt Ausgangsleistung liegen um einen Bereich von 0,5 nm um diese Linie (vgl. Abbildung 12 d)). Bei der gewählten Faserlänge wurde eine Pulsspitzenleistung von 630 W erreicht, was einer CW-Leistung von ~ 30 mW entspricht. An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass die CW-Leistung durch eine höhere Repetitionsrate auf einige Watt erhöht werden kann. Da dann Unreinheiten auf Faserenden zum Einbrennen führen können, wurde an dieser Stelle auf eine Maximierung der Durchschnittsleistung verzichtet.

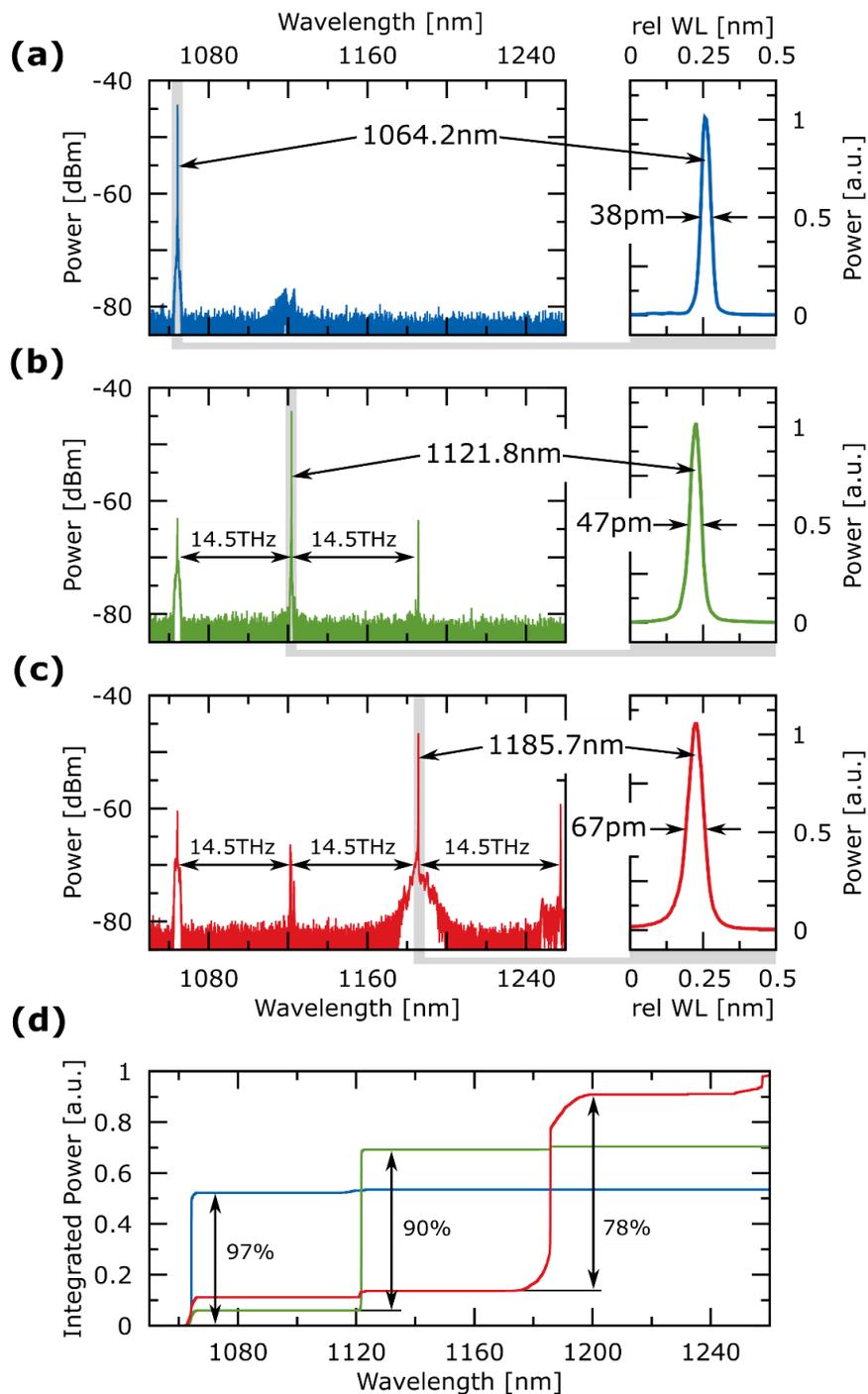


Abbildung 12: Spektren nach dem Faserausgang, optimiert für unterschiedliche Wellenlängen. a) für 1064 nm, b) für 1122 nm, c) für 1186 nm. d) zeigt die integrierte Leistung für die verschiedenen Spektren.

Als nächstes wurde die Leistung bei 1122 nm maximiert. Die Verstärkung der 1122 nm Pulse basiert auf Ramanverstärkung in der Faser. Die intensiven 1064 nm Pulse dienen dabei als Pumpulse für einen stimulierten Raman Streuprozess. Da Ramanstreuung ein instantaner und kohärenter Vorgang ist, werden die zeitlichen Eigenschaften des Pumpulses auf das Stokes-gestreute Licht, also die 1122 nm

Pulse, übertragen. Somit ergibt sich für die Pulse mit längeren Wellenlängen die gleiche Pulsdauer wie für die 1064 nm Pulse und die spektralen Eigenschaften werden vom 1122 nm Seed übernommen. Um nun intensive Pulse bei 1122 nm zu erhalten, wurde die 1122 nm Seed-Laserdiode aktiviert und die Leistung der 1064 nm Pulse erhöht. Dafür wurde die Pumpleistung im DC-YDFA erhöht, bis es zu einer weiteren Verschiebung der Leistung zu längeren Wellenlängen kam (vgl. Abbildung 12 b). So optimiert, war mehr als 90 % der gesamten Ausgangsleistung in einem Bereich von 0,5 nm um die 1122 nm Linie. Die Linienbreite konnte zu 47 pm und die Spitzenleistung für die 1122 nm Pulse zu 750 W bestimmt werden.

Wenn man nun die Leistung weiter erhöht, würde man erwarten, das breite Ramanpektrum der Glasfaser um 1180 nm zu sehen. Solche kaskadierte Raman Spektren sind auch in der Literatur zu finden [55, 77]. Im Gegensatz zu diesen Raman Lasern, bei denen das breite Raman Spektrum kaskadiert verstärkt wurde, wurde hier jedoch eine spektral schmalbandige Linie bei 1186 nm beobachtet. Die spektrale Breite dieser Linie wurde zu 67 pm bestimmt und bei einer Gesamtspitzenleistung von 1,15 kW waren ca. 80 % der Leistung (vgl. Abbildung 12 d) , also ca. 900 W, in einem Bereich von ± 5 nm um diese Linie konzentriert. Zusätzlich ist in Abbildung 12 eine weitere schmalbandige Komponente bei einer Wellenlänge von 1257 nm zu erkennen. Der Abstand in optischer Frequenz zwischen den vier schmalbandigen Linien bei 1064 nm, 1122 nm, 1186 nm und 1257 nm beträgt jeweils 14,5 THz.

In Abbildung 12 c) ist außerdem zu sehen, dass die spektrale Komponente um 1122 nm, die als Zwischenzustand die Energie von den intensiven 1064 nm Pulsen weiter zu den 1186 nm Pulsen leitet, um fast 20 dB gegenüber den 1186 nm Pulsen unterdrückt ist. Der größte Anteil von Licht außerhalb der 1186 nm Bande ist bei 1064 nm und bei 1257 nm anzutreffen. Erstere Komponente könnte im Spektrum überrepräsentiert sein, da durch den ASE Untergrund der Verstärkerstufen ständig Licht um 1064 nm vorhanden ist. Der Beitrag von 1257 nm Licht könnte durch eine bessere Anpassung der Pulsparameter, sprich einer geringen Reduzierung der Leistung, reduziert werden.

2.4.3 Bestätigung der Theorie der Wellenlängenverschiebung durch qualitative Überlegungen und Simulation

Normalerweise erhält man schmalbandige kaskadierte Ramanverstärkung entweder durch Anregung mit designierten Lasern, auch Seed genannt [61] oder mit Resonatoren für die gewünschten Wellenlängen [56, 60]. Für die Wellenlängen

1186 nm und 1257 nm wurde keine dieser wellenlängenselektiven Methoden verwendet. Das schmalbandige Licht bei diesen Wellenlängen wird im System ohne zusätzliche Komponenten erzeugt. Im Folgenden wird gezeigt, dass das Erzeugen dieser spektralen Anteile durch eine Kombination aus SRS und FWM zustande kommen kann, bei der die durch FWM erzeugten Photonen den Ramanstreuprozess anregen (im Folgenden auch seeden genannt). Ausschlaggebend für die Vermutung, dass FWM eine tragende Rolle spielt, ist der oben erwähnte äquidistante Abstand (vgl. Abbildung 12 b), c) und Abbildung 13 a)) in optischer Frequenz der beteiligten spektralen Komponenten [51].

FWM in SMF ist ein ausführlich studiertes Phänomen. Im Bereich der optischen Datenübertragung ist dies ein limitierender Faktor. Bei spektral gebündelten Signalen verursacht FWM ein Übersprechen zwischen den Kanälen und begrenzt so die Anzahl der Kanäle und Übertragungstrecken [51]. Ebenso auf FWM zurückzuführen ist die sog. modulation instability (MI) [48], bei der neue spektrale Komponenten symmetrisch um intensives Pumplicht erzeugt werden. Da dies die maximale Leistung limitiert, wird dies auch als unerwünschter Effekt angesehen. Im Gegensatz zu SRS ist FWM jedoch Mechanismus, der Phasenanpassung benötigt [78]. Im Fall von ausgeprägter linearer Dispersion, wie sie bei SMF im Bereich um 1100 nm vorliegt, ist eine perfekte Phasenanpassung normalerweise nicht möglich. Ein initialer FWM Prozess wird nach einer gewissen Länge, der Kohärenzlänge für diesen Vorgang, nicht mehr möglich sein, weil sich die Phase der beteiligten optischen Felder nach dieser Länge um eine Halbperiode unterscheiden [72]. Das bedeutet auch, dass nicht phasengepasstes FWM für bestimmte Anwendung eine Limitierung darstellt, aber nicht ausreicht, um effizient Leistung zu anderen Wellenlängen zu konvertieren.

Um dies auch für diesen Fall zu zeigen, wird im Folgenden die Kohärenzlänge mit $L_{\text{coh}} = \pi/\Delta k$ für die beteiligten Wellenlängen 1064 nm, 1122 nm und 1186 nm abgeschätzt, wobei Δk die Phasenfehlanpassung charakterisiert. Nach [72] kann dieses Δk folgendermaßen abgeschätzt werden $\Delta k = 2\pi\lambda D(\lambda)\Omega^2$. $D(\lambda)$ gibt dabei die Materialdispersion an, λ die Wellenlänge und Ω den Energieunterschied zwischen der Pumpwellenlänge und den Signal- und Idlerwellenlängen. Für $D(1186\text{nm})$ wurde der Wert zu $D = 0,0056$ bestimmt [79]. Die Idlerwellenlänge ist $\lambda=1186$ nm und der Energieunterschied zwischen Pump- und Idlerwellenlänge beträgt $\Omega = 483 \text{ cm}^{-1}$. Daraus resultiert eine Phasenfehlanpassung von $\sim 97 \text{ m}^{-1}$ und somit eine Kohärenzlänge von $\sim 3,5$ cm. Das bedeutet, dass nach nur wenigen Zentimetern der FWM Prozess nicht mehr stattfinden kann und FWM alleine nicht ausreicht, um Licht bei 1186 nm effizient zu erzeugen.

In diesem Modell wird daher davon ausgegangen, dass eine Kombination aus FWM und SRS zu einer effizienten Erzeugung von 1186 nm Photonen führt. Dabei dient das innerhalb der Kohärenzlänge erzeugte Licht bei 1186 nm als Seed für einen Ramanverstärkungsprozess in der Faser, analog zur Verstärkung der 1122 nm Pulse. Diese überlagerte Ramanverstärkung bricht somit die ständige Konversion und Rückkonversion von FWM und führt zu einer effektiven Verstärkung der wenigen Seedphotonen bei 1186 nm. Obwohl die Kombination beider Effekte bereits eingehend untersucht wurde[73-76], konnte ein schmalbandiger kaskadierter Betrieb bis jetzt nicht realisiert werden.

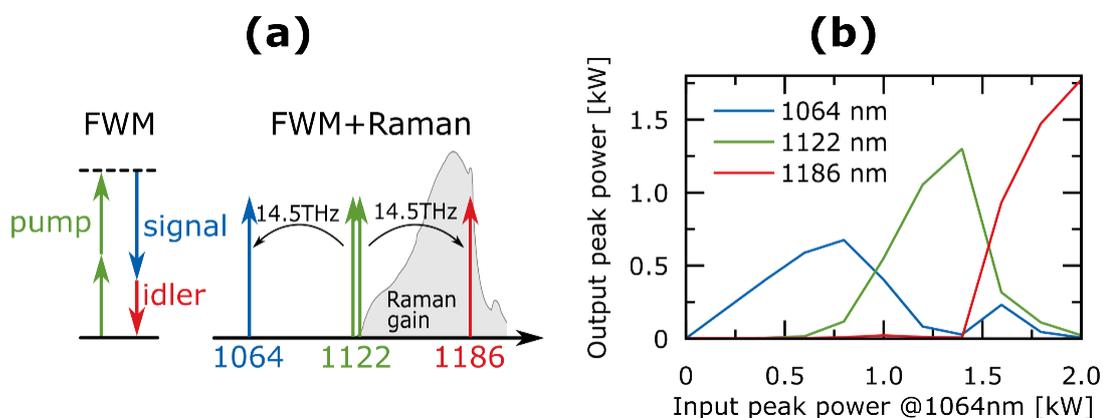


Abbildung 13: a) Theorie FWM und SRS für Wellenlängenverschieben b) Simulation der Ausgangsleistung für die unterschiedlichen spektralen Kanäle bei Variation der Eingangsleistung des 1064 nm Lasers

Um die obigen qualitativen Überlegungen zu bestätigen, wurde eine numerische Simulation durchgeführt, die nur die oben erwähnten Effekte, SRS und FWM, berücksichtigt¹. Die Simulationen basieren auf gekoppelten Amplitudengleichungen für die drei beteiligten optischen Felder für Licht bei den Wellenlängen von 1064 nm, 1122 nm und 1186 nm [51]. In diesem Modell werden die Felder als monochromatisch angenommen und Beiträge über die erste Raman-Stokes Verschiebung hinaus vernachlässigt. Die Simulation enthält keine Fitparameter, d.h., alle Parameter wurden aus Material- und Faserspezifikationen abgeleitet. Abbildung 13 b) zeigt die Ausgangsleistung für die drei verschiedenen Wellenlängen nach einer festen Faserkombination von 2 m SMF28 und 2 m Hi1060 Faser. Die Seedleistung für 1122 nm wurde fest auf 5 mW eingestellt und die Eingangsleistung für die 1064 nm Pulse von 0 kW bis 2,0 kW variiert. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, gibt es bestimmte Leistungsbereiche für die 1064 nm Pulse, in denen hauptsächlich eine

¹ Diese Simulation wurde Prof. Dr.-Ing. Christian Jirauschek (TU München) im Rahmen einer gemeinsamen Publikation erstellt und von mir angepasst.

der drei Wellenlängen erzeugt wird. Die Leistungslevels stimmen gut mit den experimentellen Beobachtungen überein. Außerdem ist zu erkennen, dass die Pumpfelder fast die komplette Leistung abgeben, was auch von anderen beobachtet wurde [58, 73, 80]. Somit lässt sich erkennen, dass man die Ausgabewellenlänge direkt über die Leistung bei 1064 nm steuern kann. Dieses wird im nächsten Unterkapitel näher betrachtet.

2.4.4 Puls-zu-Puls Wellenlängenschalten durch Modulation der Seed-Dioden

Durch die obigen Beobachtungen und bestätigt durch die Simulation ergeben sich die beiden wichtigsten Kontrollmechanismen für den Wellenlängenverschiebungsprozess: a) die Leistung der 1064 nm Pulse und b) die Aktivierung der 1122 nm Seed-Laserdiode. Die Leistung der 1064 nm Pulse kann vor allem durch die Anpassung der Pumpleistung der YDFAs skaliert werden. Es ist jedoch auch möglich, bei konstanten Verstärkungsfaktoren für die YDFAs, die Ausgangsleistung in einem eingeschränkten Maße durch Modulation der 1064 nm Seed-Laserdiode zu steuern. Da beide Seed-Laserdioden schnell modulierbare Halbleiterlaserdioden sind, ist es möglich, deren Leistung auf der Zeitskala von einigen Nanosekunden zu steuern. Dies ermöglicht es vor allem, die 1064 nm Leistung schneller zu variieren, als über die Pumpleistung der YDFAs. Dort ist die Modulationsgeschwindigkeit nämlich nicht über die Pumpdioden gegeben, die ebenfalls schnell modulierbar wären, sondern durch die Lebenszeit der angeregten Ytterbium Atome bestimmt, welche im Bereich von Millisekunden liegt [32].

Mit der Kombination des Wellenlängenverschiebungsmechanismus und den schnell modulierbaren Seed-Laserdioden ist es möglich, die Wellenlänge von Puls zu Puls zu schalten. Dies wird im Folgenden mit den drei oben genannten Wellenlängen gezeigt. Abbildung 14 zeigt das Wellenlängenschalten von Puls zu Puls in einer zeitaufgelösten Darstellung. Die Pulse wurden mit einer Selbstbau 500 MHz Freistrahlphotodiode und einem 1 GHz Echtzeitoszilloskop aufgenommen. Die linken Grafiken zeigen 10 aufeinanderfolgende Pulse mit einer Repetitionsrate von 50 kHz. Dabei wurden zwei Aufnahmen übereinander gelegt. Einmal wurde mit einem geeigneten Kurzpassfilter die blaue spektrale Komponente aufgenommen und einmal mit einem geeigneten Langpassfilter die rote spektrale Komponente. Die Überlagerung zeigt, dass die Wellenlänge für jeden Puls mit einem hohen Auslöschfaktor geschaltet wird, da von der jeweiligen anderen Wellenlänge weniger als 10 % Überlagerung erkennbar ist. Die Grafiken auf der rechten Seite von Abbildung 14

zeigen einen zeitlichen Zoom-In in die letzten beiden Pulse. Dort ist deutlich zu erkennen, dass nur ein sehr geringer Teil der jeweils anderen Wellenlänge im Puls vorhanden ist. Außerdem ist zu erkennen, dass die Pulsbreite der 1064 nm Pump-pulse von 1,4 ns auf die Pulse mit längeren Wellenlängen übertragen wird.

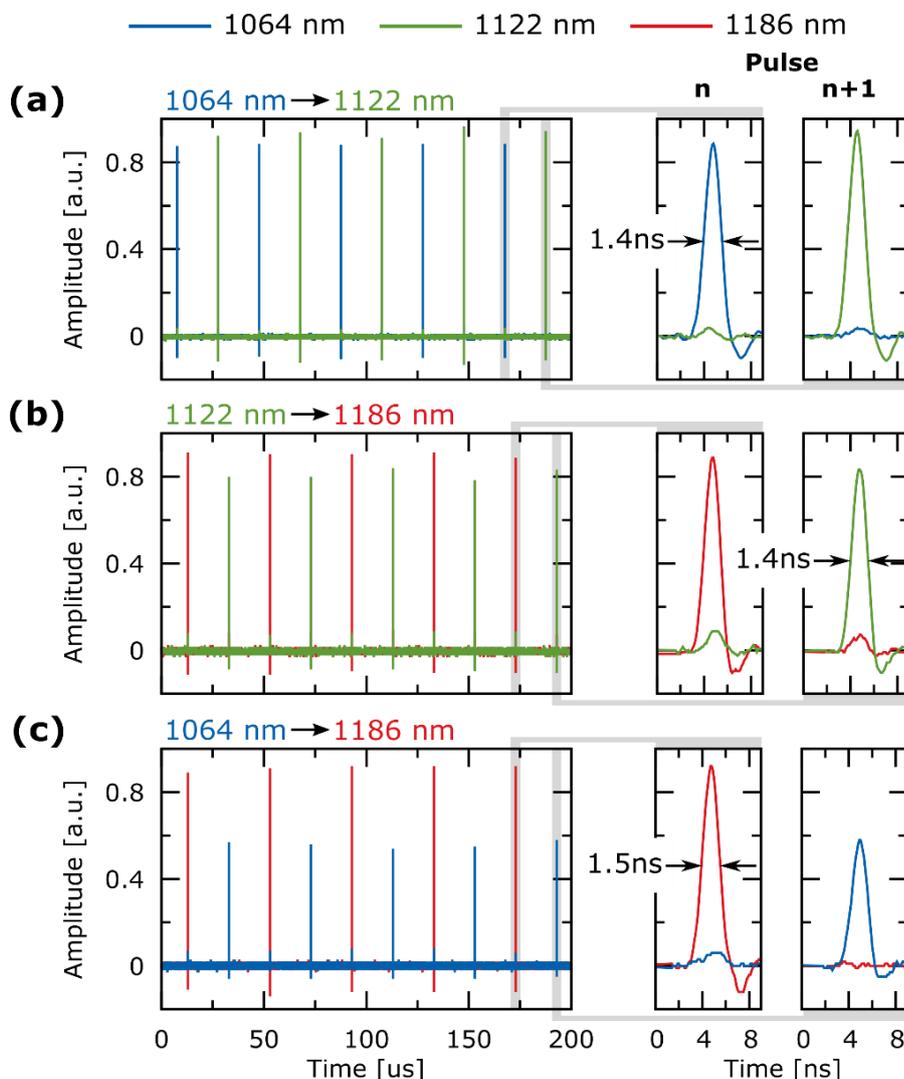


Abbildung 14: Oszilloskop Aufnahmen des Wellenlängenschaltens von Puls-zu-Puls. Links: Überblicksaufnahme, Rechts: Zoom-In in zwei aufeinanderfolgende Pulse, um den hohen Unterdrückungsfaktor zu erkennen. a) 1064 nm zu 1122 nm, b) 1122 nm zu 1186 nm, c) 1064 nm zu 1186 nm.

In Abbildung 14 sind nacheinander verschiedene Konfigurationen für das Wellenlängenschalten zwischen jeweils zwei der drei Wellenlängen dargestellt. Für das Wellenlängenschalten von 1064 nm auf 1122 nm wurde die Leistung der 1064 nm Pulse erhöht, bis die Ramanschwelle erreicht wurde. Dann wurde für jeden zweiten Puls die 1122 nm Seed-Laserdiode aktiviert. In Abbildung 14 a) ist erkennbar, dass

dadurch für einen Puls fast ausschließlich Licht bei 1064 nm vorhanden ist und einmal nur bei 1122 nm. Dabei erreichen beide spektrale Komponenten die gleiche Pulsspitzenleistung von ca. 600 W. Für das Schalten zwischen 1122 nm und 1186 nm wurde die 1122 nm Seed-Laserdiode aktiviert und die 1064 nm Pulsleistung soweit erhöht, bis effizient Licht bei 1186 nm erzeugt wurde. Dann wurde die 1064 nm Pulsleistung moduliert, indem die Seed-Laserdiode mit einem schnellen Laserdiodentreiber (WieserLabs, WL-LDC10D) moduliert wurde. Eine Variation von ca. 20 % der Seedleistung ergab dabei die besten Ergebnisse. Auch hier betrug der Anteil an spektralen Komponenten außerhalb des gewünschten Wellenlängenbereichs weniger als 10 %, wie in Abbildung 14 b) erkennbar ist. Die letzte Kombination, zwischen der Puls-zu-Puls Schalten gezeigt wird, ist das Schalten von 1064 nm zu 1186 nm. Um dies zu erreichen, musste die Modulationstiefe der 1064 nm Seed-Laserdiode auf ca. 50 % erhöht werden. Damit konnte erreicht werden, dass die Ramanschwelle für die 1064 nm Pulse noch nicht erreicht wurde und für die Pulse, die zu 1186 nm verschoben werden sollen, deutlich überschritten wurde. Für letztere Pulse wurde zusätzlich die 1122 nm Seed-Laserdiode aktiviert, um eine effiziente Wellenlängenverschiebung zu erreichen. In Abbildung 14 c) ist deutlich zu erkennen, dass für die 1186 nm Pulse insgesamt mehr Pulsenergie erreicht werden kann.

Insgesamt erkennt man bei allen Kombinationen, dass die Pumpwellenlänge fast vollständig zur längeren Wellenlänge konvertiert wird und so eine sehr effiziente Leistungsverschiebung zu längeren Wellenlängen möglich ist. Die Tatsache, dass der Pumpimpuls fast vollständig zu längeren Wellenlängen konvertiert wird, ist, wie oben erwähnt, bereits beobachtet worden [58, 73, 80]. Diese sehr definierte Konversion mit einer hohen Unterdrückung der nicht gewünschten Wellenlänge wird durch die hier gewählte Pulsform erreicht. Wie in Abbildung 11 in Kapitel 2.3 zu sehen ist, haben die Pulse eine ausgeprägte Rechteckform mit steilen steigenden und fallenden Flanken und einem langen Bereich mit konstanter Leistung. Ganz im Gegensatz zu gaußförmigen Pulsen, wie man sie z.B. aus modengekoppelten Lasern erhält, bei denen nie eine konstante Leistung erreicht wird. Der Bereich der konstanten Leistung ist für das effiziente Wellenlängenverschieben wichtig, da die zu Grunde liegenden nichtlinearen Effekte sehr scharfe Schwellwerte haben. Sobald man diese überschreitet, findet eine signifikante Änderung im Spektrum statt. Wenn man nun die Leistung des Plateaus so einstellt, dass die gewünschten Effekte eintreten, so kann der gesamte Bereich des Plateaus zu längeren Wellenlängen verschoben werden und nur die steilen Flanken, in denen die Leistung noch zu gering ist, bleiben bei der alten Wellenlänge übrig. Somit ist die hohe Effizienz des Wellenlängenschaltens vor allem auch in der Rechteckform der Pulse begründet.

2.5 Fazit und Ausblick aktiv modulierter Faserlaser

Der in diesem Kapitel vorgestellte Faserlaser ist robust, einfach und kostengünstig zu realisieren. Das macht ihn zu einem idealen Laser für verschiedene Anwendungen. Die anfangs beschriebenen Anforderungen für die Multiphotonenbildung erfüllt dieser Laser weitgehend. So erlaubt es die aktive Modulation sehr variable Pulsmuster abzugeben und verschiedene Tastverhältnisse einzustellen. Die Spitzenleistung mit etwas weniger als 1 kW ist ausreichend, um die gewünschten nichtlinearen Effekte hervorzurufen und mit einer Auswahl an drei verschiedenen Ausgabewellenlängen bietet der Laser auch eine spektrale Flexibilität, die in der Kombination mit Puls-zu-Puls Wellenlängenschaltern einzigartig ist. Somit ist das Ziel erreicht, einen Anregelaser für die Multiphotonenbildung aufzubauen.

Mit Blick auf die Weiterentwicklung der Lichtquelle gibt es noch Verbesserungen, die in Zukunft implementiert werden können. Zum einen können Maßnahmen getroffen werden, um höhere Leistungen zu erhalten. Dabei limitiert SRS die erreichbaren Pulsspitzenleistungen. Mit zwei Maßnahmen kann diese Limitierung umgangen werden. Zum einen können die Fasern weiter gekürzt werden, um die Interaktionslänge für SRS zu verkürzen und zum anderen können Verstärkungsfasern mit einem größeren Modenfelddurchmesser genutzt werden, um die Intensität im Kern zu verringern. Neben der Pulsspitzenleistung ist auch die maximale CW-Leistung limitiert. Eine zu hohe Intensität am Faserende bewirkt ein Einbrennen selbiger. Auch diese Limitierung kann mit einer Vergrößerung des Modenfelddurchmessers umgangen werden. Dazu kann man die oben erwähnten Fasern mit größerem Modenfelddurchmesser benutzen oder aber, man weitet das Strahlprofil erst kurz vor dem Übergang Glas-Luft auf, um die Intensität dort zu verringern. Dazu eignen sich wenige 100 μm lange kernlose Faserendstücke, die auf die Monomodenfaser mit kleinem Strahldurchmesser gespleisst werden. In diesen kernlosen Faserstücken kann sich das Modenprofil vergrößern und der Schwellwert für thermische Zerstörung der Faser wird zu höheren Leistungen verschoben. Die Ausgabeleistung des Lasers kann somit noch weiter skaliert werden.

Neben der Leistung kann auch die spektrale Flexibilität verbessert werden. Trotz der drei möglichen Ausgabewellenlängen ist die spektrale Abdeckung der Lichtquelle im Vergleich zu z.B. Ti:Sa Lasern noch sehr gering. Es gibt jedoch Maßnahmen, um diesen Nachteil auszugleichen. Eine Möglichkeit, längere Wellenlängen zu erhalten, wurde in einer von mir betreuten Masterarbeit untersucht [81]. Dabei wurde ein ähnlicher Laser, wie der hier beschriebene, als Pumpe für das Erzeugen eines Supercontinuum in mehreren Metern Glasfaser genutzt. Damit konnte ein spektraler Bereich von 1200 nm – 1700 nm abgedeckt werden. Jedoch kann man

damit Licht nur effizient rot verschoben. D.h., dass die Bereiche unter 1000 nm damit nicht erreicht werden können, was aber z.B. nötig wäre, um einen der wichtigsten Fluorophore, das grün fluoreszierende Protein, anzuregen[82]. Um zu kürzeren Wellenlängen zu kommen, kann der hier behandelte Laser als Pumpe für parametrische Verstärkung benutzt werden. Diese, in der Einführung des Kapitels angesprochenen Mechanismen, basierend auf FWM in PCF, haben großes Potential, die relevanten Wellenlängen für eine Vielzahl der wichtigsten Fluorophore bereitzustellen. Als dritte Methode, um die spektrale Flexibilität des Lasers zu erhöhen, kann man die Ausgabewellenlängen frequenzverdoppeln. Damit erhält man intensive Lichtpulse im sichtbaren Spektralbereich, die unter anderem auch für die Multiphotonenbildung von Interesse sind.

Trotz der angesprochenen Verbesserungsmöglichkeiten, bietet der Laser bereits ideale Anregungsparameter für die Multiphotonenbildung. Die Anwendung dieser Lichtquelle für diesen Einsatzzweck wird in den nächsten Kapiteln beschrieben.

3 Multiphotonenmikroskopie mit Sub-Nanosekunden Pulsen

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die Multiphotonen-Mikroskopie eine leistungsstarke Technik für eine spezifische, dreidimensionale und hochauflösende Untersuchung von Gewebeproben bis zu 1 mm Dicke. Aktuelle Mikroskopiesysteme für die TPEF-Bildgebung verwenden Ultrakurzpulslaser (~ 100 fs – 10 ps), um die hohen Intensitäten zu erreichen, die für die nichtlineare Anregung erforderlich sind. Dies liegt daran, dass die durchschnittliche Leistung durch die thermische Schwellenschwelle der Probe begrenzt ist und die meisten Lasersysteme mit einer festen, sehr hohen Pulswiederholrate (~ 80 MHz) operieren. Die Folge: Kürzere Pulse erzeugen höhere Spitzenleistungen und somit höhere Signallevel.

Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass auch mit längeren Pulsen im Bereich von einigen 10 ps bis zu wenigen Nanosekunden Multiphotonen-Bildgebung möglich ist [24-28, 41, 83-85]. Insbesondere bei gleichen Spitzenleistungen kann die Wiederholrate gesenkt werden, so dass das gleiche Tastverhältnis und damit die gleiche mittlere Leistung erreicht wird. Der Vorteil der Verwendung längerer Pulse, insbesondere bei der faserbasierten Strahlführung, liegt in der geringen spektralen Breite, so dass die chromatische Dispersion im System vernachlässigbar ist. Darüber hinaus verhindert der viel geringere Intensitätsanstieg Selbstphasenmodulation (engl. self phase modulation, SPM). Dies gilt insbesondere für Glasfasern, bei denen lange Wechselwirkungslängen auftreten. Glasfaserbasierte optische Systeme sind wünschenswert, da sie eine stabile monomodige Strahlqualität liefern, die für starkes Fokussieren essentiell ist. Aber noch wichtiger ist, dass in der biologischen Bildgebung die Eindringtiefen in Gewebe auf ~ 100 μm – 1 mm begrenzt ist. Will man in tieferliegende Schichten vordringen, so ist das nur mit Hilfe von Faserendoskopen möglich, die auf eine kompatible Lichtquelle angewiesen sind [10, 86].

Um jedoch längere Pulse verwenden zu können, muss die Bildqualität mit bestehenden Systemen konkurrieren können. Außerdem können bei stark unterschiedlichen Pulslängen auch unterschiedliche Effekte in der Probe eine Rolle spielen. Auf diese Punkte wird in diesem Kapitel näher eingegangen. Im ersten Teil wird die oben beschriebene Sub-Nanosekunden Lichtquelle mit einem kommerziell erhältlichen Ultrakurzpulslaser bezüglich TPEF Bildqualität verglichen. Nachdem diese Versuche sehr vielversprechend waren, wurde ein Multiphotonenmikroskop aufgebaut, um weitere Fragestellungen hinsichtlich der Anwendbarkeit der Sub-Nanosekundenpulse für die Multiphotonenbildgebung bearbeiten zu können. Dieses wird im zweiten Teil vorgestellt und charakterisiert. Im dritten Abschnitt dieses Kapitels

werden Ergebnisse mit Anregung bei 1064 nm und im vierten Abschnitt Ergebnisse mit den rot verschobenen Wellenlängen vorgestellt.

Erkenntnisse, die im Zuge der Erforschung von Sub-Nanosekunden Pulsen für Multiphotonenbildung erlangt wurden, sind unter anderem in folgenden Beiträgen veröffentlicht worden:

1. Eibl, M., D. Weng, H. Hakert, S. Karpf, J.P. Kolb, T. Pfeiffer, J.E. Hundt, and R. Huber, *Wavelength agile multi-photon microscopy with a fiber amplified diode laser*. in preparation.
2. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Blömker, and R. Huber. *Pulse-to-pulse wavelength switching of diode based fiber laser for multi-color multi-photon imaging*. in *Proc. SPIE 10083*, 2017.
3. Karpf, S., M. Eibl, B. Sauer, F. Reinholz, G. Hüttmann, and R. Huber, *Two-photon microscopy using fiber-based nanosecond excitation*. *Biomedical Optics Express*, **7**(7) 2016.
4. Karpf, S., M. Eibl, and R. Huber. *Nanosecond two-photon excitation fluorescence imaging with a multi color fiber MOPA laser*. in *Proc. SPIE 9536*, 2015.

3.1 Vergleich des Sub-Nanosekunden Lasers mit einem Ultrakurzpulslaser

Wie anfangs bereits erwähnt, benötigt die Zwei-Photonenmikroskopie eine Lichtquelle mit hoher instantaner Leistung. Als übliche Anregungslichtquelle wird dafür meist ein Ultrakurzpulslaser, in der Regel ein Ti:Sa-Laser eingesetzt [9, 12, 87]. Um die Anwendbarkeit der Sub-Nanosekunden Pulse zu evaluieren, wurde deshalb ein Vergleich mit einem Ultrakurzpulslaser angestellt. Der Vergleich wurde am TriM-Scope I Multiphotonen-Mikroskop (LaVision BioTec) am Institut für BioMedizinische Optik, Lübeck durchgeführt. Dieses Mikroskop ist mit einem Ti:Sa-Laser (Chameleon, Coherent) und einem angeschlossenen OPO (optisch parametrischer Oszillator, Chameleon-OPO, APE) ausgestattet. Der OPO stellt Pulse mit ~ 200 fs Länge bei einer Repetitionsrate von ~ 80 MHz zur Verfügung [88]. Mit diesem System wird der oben beschriebene Faserlaser bezüglich Anwendbarkeit für Zwei-Photonenmikroskopie verglichen. In diesem Kapitel werden zuerst theoretische Überlegungen für den Vergleich angestellt, die Bildgebungsparameter bestimmt und anschließend die Ergebnisse mit beiden Systemen analysiert.

3.1.1 Theoretische Überlegungen bezüglich der Unterschiede in Pulslänge und Repetitionsrate

Um die beiden unterschiedlichen Anregungslaser miteinander vergleichen zu können, werden hier Überlegungen vorangestellt, die die Unterschiede in Pulslänge und Repetitionsrate in Relation setzen. Zuerst wird berechnet, mit welchen Parametern man gleiche Bildqualität, d.h. die gleiche Fluoreszenzintensität, erwarten kann. Des Weiteren werden wichtige Licht-Gewebe/Molekül-Interaktionen qualitativ betrachtet.

Um die gleiche Bildqualität mit beiden System zu erhalten, müssen mit beiden Systemen die gleiche Anzahl an Fluoreszenzphotonen erzeugt werden. Die Anzahl der absorbierten Photonen n_a pro Fluorophor und pro Anregungspuls gibt genau darüber Aufschluss und kann mit folgender Formel berechnet werden [4]:

$$n_a = \frac{P_{\text{avg}}^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{NA^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2 = \frac{P_{\text{avg}}^2}{\tau_p f_p^2} \cdot S \quad 3.1$$

Dabei gibt P_{avg} die Durchschnittsleistung des Lasers, δ den Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt, τ_p die Pulslänge, f_p die Repetitionsrate, NA die numerische Apertur des verwendeten Objektivs, c die Lichtgeschwindigkeit, \hbar die reduzierte Planck-Konstante und λ die Wellenlänge des Anregungslichts an. Sofern man sich

nicht im Bereich der Sättigung befindet, d.h. dass nicht mehr als zwei Photonen pro Fluorophor absorbiert werden, ist n_a kleiner als 1 und gibt dann die Wahrscheinlichkeit der Absorption einer Zweiphotonenanregung an [89]. In Gleichung 3.1 erkennt man, dass eine höhere Dauerleistung P_{avg} zu einer höheren Absorptionswahrscheinlichkeit führt. Außerdem reduzieren längere Pulse und eine höhere Repetitionsrate die Absorptionswahrscheinlichkeit. Anhand dieser Gleichung lässt sich abschätzen, ob die gewählten Anregungsparameter für Zweiphotonenabsorption geeignet sind, oder, ob bereits eine Sättigung der Fluorophore pro Puls zu erwarten ist.

Um die Gleichung 3.1 zu vereinfachen und die Laser unabhängigen Parameter auszuklammern, wurden die Systemparameter im Faktor $S = \delta(NA^2/2\hbar c\lambda)^2$ zusammengefasst. Setzt man außerdem für die Durchschnittsleistung einen Ausdruck ein, der die Pulsspitzenleistung enthält, $P_{\text{avg}} = P_{\text{peak}}\tau_p f_p$, kann man Gleichung 3.1 folgendermaßen umstellen:

$$n_a = P_{\text{peak}}^2 \cdot \tau_p \cdot S \quad 3.2$$

Dieser Ausdruck hat die gleiche Aussagekraft, wie Gleichung 3.1, man erkennt aber noch besser die wichtigsten Pulsparameter. So hängt die Absorptionswahrscheinlichkeit direkt vom Quadrat der instantanen Pulsspitzenleistung ab. Außerdem bedeuten längere Pulse eine längere Interaktion und das bedingt eine höhere Absorptionswahrscheinlichkeit.

Da diese beiden Ausdrücke auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen, so erhöht einmal die Pulslänge die Absorptionswahrscheinlichkeit und einmal erniedrigt sie sie, reicht diese Betrachtung für eine Bewertung der Eignung der Laser für TPEF Mikroskopie nicht aus. Um nämlich die Bildqualität zwischen zwei so unterschiedlichen Anregungslasern, mit um Größenordnung unterschiedlichen Repetitionsraten, vergleichen zu können, muss die Anzahl der absorbierten Photonen pro Pixel N_a betrachtet werden. Werden mit beiden Lasern innerhalb eines Pixels gleich viele Fluorophore angeregt, erwartet man auch die gleiche Intensität für diesen Pixel und somit die gleiche Bildqualität. Deshalb wird die Anzahl der absorbierten Photonen über die Aufnahmezeit für einen Pixel, die sogenannte pixel dwell time t_{px} , aufsummiert und als Vergleichsgröße herangezogen. Diese Summierung lässt sich einfach als Produkt aus Anregungswahrscheinlichkeit pro Puls n_a und der Anzahl der Pulse während der Verweildauer auf einem Pixel $f_p \cdot t_{\text{px}}$ darstellen:

$$N_a = \sum_{n_{\text{group}}} n_a = n_a \cdot f_p \cdot t_{\text{px}} = \frac{P_{\text{avg}}^2}{\tau_p f_p^2} \cdot S \cdot f_p \cdot t_{\text{px}} = \frac{P_{\text{avg}}^2}{\tau_p f_p} \cdot S \cdot t_{\text{px}} \quad 3.3$$

In dieser Gleichung ist zu erkennen, dass die Anzahl der absorbierten Photonen nur noch in zwei Parametern von der Lichtquelle abhängt. Die Dauerstrichleistung P_{avg} ist durch die Zerstörschwelle der Probe gegeben und wird für beide Laser gleich angenommen, die Systemparameter S werden durch die Optiken und die Fluorophore bestimmt bzw. vorgegeben und die Pixelverweildauer t_{px} soll für den Vergleich gleich gehalten werden. Es bleiben also noch die Pulslänge τ_p und die Repetitionsrate f_p als Unterscheidungsmerkmale übrig. Das Produkt dieser beiden Parameter ist als Tastverhältnis (engl. duty cycle, DC) bekannt:

$$\text{DC} = \tau_p \cdot f_p \quad 3.4$$

Somit lässt sich Gleichung 3.3 folgendermaßen umstellen:

$$N_a = \frac{1}{\text{DC}} \cdot P_{\text{avg}}^2 \cdot S \cdot t_{\text{px}} \quad 3.5$$

Das bedeutet nun, dass man bei gleichem Tastverhältnis auch die gleiche Bildqualität für ein TPEF-Bild erwartet. Obwohl dieser Zusammenhang weithin bekannt ist, wird oft versucht, die Pulslänge zu optimieren, anstatt die Repetitionsrate zu verändern. Dies hat wohl mit der Tatsache zu tun, dass die üblicherweise verwendeten Ti:Sa Laser eine feste Repetitionsrate haben und nur die Pulslänge durch optimieren verschiedener Parameter angepasst werden kann. Durch die Einführung von halbleiterbasierten Lasern, welche in der Regel nicht so kurze Pulse erreichen, bei denen jedoch teilweise die Repetitionsrate eingestellt werden kann, wurde der Einfluss des Tastverhältnisses zwar explizit erwähnt [25, 28, 84], jedoch nicht weiter untersucht oder Vergleiche angestellt.

Obwohl für zwei Laser mit gleichem Tastverhältnis gleiche Anregungsraten erwartet werden können, können stark unterschiedliche Pulslängen und Repetitionsraten andere Auswirkungen haben. Betrachtet man nämlich typische Zeitkonstanten der zu untersuchenden Probe, so können sich unterschiedliche Effekte einstellen. Die drei wichtigsten Zeitkonstanten werden hier mit folgenden Größen angenommen: die molekulare S_1 – Lebenszeit ($\tau_S \sim 0,5\text{-}10$ ns) [90], die Lebenszeit von langlebigen Triplettzuständen ($\tau_T \sim \mu\text{s}$) [90] und die charakteristische thermische Diffusionszeit ($\tau_D \sim \mu\text{s}$) [91].

Betrachtet man die molekularen Singulett-Lebenszeiten von wenigen Nanosekunden und vergleicht diese mit den typischen Pulslängen und Repetitionsraten von modengekoppelten Ultrakurzpulslasern, so kann man folgendes feststellen: Die Pulslänge von ~ 100 fs ist deutlich kürzer als die Lebenszeiten und der Abstand zwischen zwei Pulsen von ~ 10 ns ist in der Regel etwas länger als die Lebenszeit. Das

bedeutet, dass die Anregeparameter optimal geeignet sind, um eine Grundzustandsverarmung und Sättigung zu vermeiden. Für Fluorophore mit sehr langen Lebenszeiten in der Größenordnung von ~ 10 ns kann es jedoch bei einer Repetitionsrate von ~ 100 MHz zu Mehrfachanregungen kommen, die potentiell zellschädigend sind. Für Sub-Nanosekunden Pulse mit Repetitionsraten unter 10 MHz ist letzteres Problem weitgehend ausgeschlossen. Die langen Pulse und somit hohe Pulsenergien könnten jedoch zu einer Sättigung führen. Schätzt man die Anregerate mit Gleichung 3.2 und typischen Werten von $\delta=10$ GM ($10^{-58}\text{m}^4/\text{s}$), $P_{\text{peak}}=100$ W, $\tau_p=0,5$ ns, $\text{NA}=0,5$ und $\lambda=1064$ nm ab, so ergibt sich eine Anregerate von $n_{a,ns} \approx 0.07$ für einen einzelnen Anregepuls, was weit von Sättigung entfernt ist.

Durch Intersystem-Crossing kann der Anregungszustand eines Moleküls von einem Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand übergehen. Diese haben eine relativ lange Lebenszeit in der Größenordnung von μs . In dieser Zeit steht das Molekül somit nicht für die Zweiphotonenanregung zur Verfügung. Die lange Zeit zwischen zwei Pulsen bei Sub-Nanosekunden Anregung ermöglicht es, dass die Triplettzustände zerfallen und eine erneute Anregung möglich ist. Dieser Effekt kann eine signifikante Intensitätszunahme bedeuten [92], wird jedoch stark von der zu untersuchenden Probe abhängen.

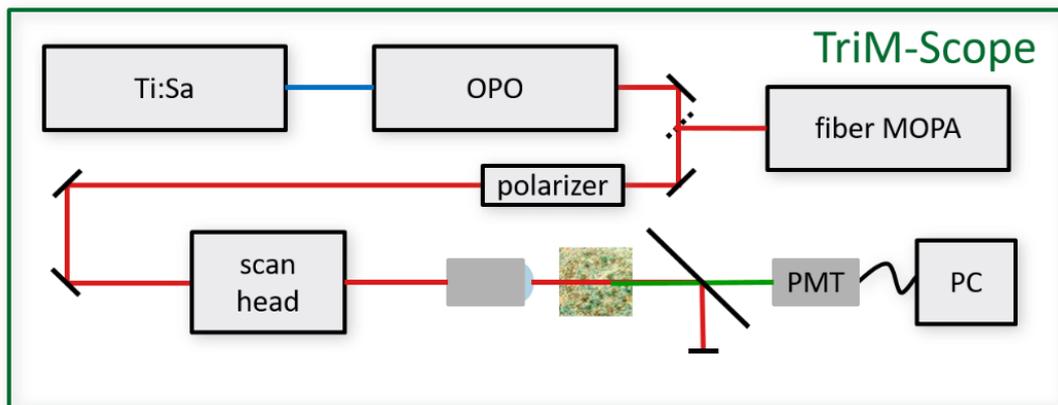
Die letzte zeitliche Größe, die betrachtet wird, ist die thermische Diffusionszeit die in der Größenordnung von $1 \mu\text{s}$ liegt. Das bedeutet, dass der Temperaturanstieg innerhalb des Fokus durch lineare Absorption mit einer Zeitkonstante von $\sim 1 \mu\text{s}$ abklingt. Diese Zeit ist ca. 100-mal langsamer, als die typische Zeit zwischen zwei Pulsen bei Ultrakurzpulslasern. Das wiederum bedeutet, dass der Temperaturanstieg vergleichbar ist mit CW-Beleuchtung. Im Gegensatz dazu ist die Separation zwischen zwei Pulsen mit einer Repetitionsrate von 1 MHz genau in der Größenordnung der thermischen Diffusionszeit. Somit erhält man in der Probe nach jedem Puls einen Temperaturanstieg, der über dem liegt, was man bei äquivalenter Dauerstrichbeleuchtung erwarten würde. Der Temperaturanstieg in Wasser für einen 1 ns langen Puls mit einer Spitzenleistung von 100 W und einer Wellenlänge von 1064 nm kann bei einem Objektiv mit einer $\text{NA}=1$ auf ~ 1 K abgeschätzt werden [93, 94]. Die Situation kann sich jedoch stark ändern, sobald sich stark absorbierende Moleküle innerhalb des Fokus befinden [95]. Sofern die transiente Erwärmung ein Problem darstellt, können verschiedene Maßnahmen ergriffen werden, um dem entgegenzuwirken. Unabhängig von der Art der Anregung kann die Leistung reduziert werden. Im Falle von Sub-Nanosekunden Pulsen kann man die Pulslänge gegebenenfalls weiter reduzieren. 100 ps statt 1 ns Pulse sind durch direkte Modulation einfach zu realisieren. Um eine Überhitzung der Probe durch die Dauerstrichbelas-

tung zu minimieren, besteht im Falle des aktiv modulierten Lasers noch die Möglichkeit die Probe mit einem definierten Muster unterabzutasten und somit den räumlichen Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen zu vergrößern. Damit bietet man mehr Fläche an, über die die Wärme abfließen kann. Durch die aktive Modulation und direkte Synchronisation mit den Scan-Spiegeln ist es möglich, die ausgelassenen Bereiche in einem darauffolgenden Scan abzutasten. Diese Art der Anregung mit verschiedenen räumlichen Abtastmustern wurde im Rahmen der von mir mitbetreuten Masterarbeit von Daniel Weng untersucht [96].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Anregungssysteme, Ultrakurzpulslaser und Sub-Nanosekundenlaser, ähnliche Ergebnisse liefern sollten. Wichtigste Voraussetzung ist dabei, dass beide Anregelaser das gleiche Tastverhältnis haben.

3.1.2 Bildgebung am TriM-Scope I mit MOPA-Laser und Ultrakurzpulslaser

Für den Vergleich wurde der Faserlaser (fiber-MOPA) in das bestehende Multiphotonen-Mikroskop TriM Scope I eingekoppelt und die Betriebsparameter auf einander abgestimmt. Eine Skizze des Aufbaus ist in Abbildung 15 zu sehen. Der Faserlaser wurde über einen Spiegel mit Magnethalterung (gestrichelte Linie) in den Strahlengang des OPOs eingebaut, welcher mit einer hohen Wiederholgenauigkeit herausgenommen und wieder eingebracht werden kann. Beide Laser werden durch einen motorisierten Polarisationsanalysator (engl. polarizer) geführt. Dieser hat zum einen die Aufgabe, durch Drehen des Analysators die Anregeleistung zu manipulieren und zum anderen ist dort ein erstes Teleskop eingebaut, um den Strahl aufzuweiten. Die Strahlen werden dann mit Spiegeln weiter abgelenkt und in den Scan-Kopf (engl. scan head) geführt. Dort sind galvanometrische Spiegel platziert, die die Strahlen ablenken um die Probe abzuscannen. Nach den Scannern ist ein weiteres Teleskop eingebaut, um die Strahlen soweit aufzuweiten, dass das verwendete Objektiv voll ausgeleuchtet wird.



**Abbildung 15: Aufbau für den Vergleich Ultrakurzpulslaser mit Sub-Nanosekundenlaser. Der Faserlaser wird über einen austauschbaren Spiegel in den optischen Weg des Ultrakurz-
pulsLasers eingekoppelt.**

Als Vergleichsprobe dient eine eingefärbte Fluoreszenzprobe eines Pflanzenstängels eines Maiglöckchens (*convallaria majalis*, Lieder GmbH). Der verwendete Farbstoff Acridinorange lässt sich gut bei einer Wellenlänge von 1064 nm anregen, weswegen beide Laser auf diese Wellenlänge eingestellt wurden.

Entscheidend für den Vergleich ist, dass die Spotgröße auf der Probe für beide Laser gleich ist. Da die Abbildungsoptiken für beide Laser gleich sind, muss für diese Voraussetzung nur der Strahldurchmesser vor diesen Optiken angepasst werden. Dazu wurde der Strahldurchmesser des OPOs mit einer Strahlprofilkamera (BC106N-VIS, Thorlabs) nach dem Polarisator vermessen. Der Durchmesser² des gaußförmigen Strahlprofils war bei einem $1/e^2$ – Intensitätsabfall 2,1 mm. Um diesen Strahldurchmesser auch mit dem Faserlaser zu erreichen, wurde ein Kollimator mit einer Brennweite von 7,5 mm verwendet, der, bei der verwendeten Faser und Wellenlänge, rechnerisch einen Strahldurchmesser von 1,7 mm vor dem Teleskop erzeugen sollte. Bei der Messung des Strahlprofils nach dem Polarisator mit Teleskop, ergab sich ein Strahldurchmesser von 2,1 mm, welcher gut mit dem Strahldurchmesser des OPOs an dieser Stelle übereinstimmt. Beide Strahlprofile sind in Abbildung 16 dargestellt. Für den MOPA-Laser sind 96 % der Leistung innerhalb des Gauß-Fits und für den OPO 87 %. Die Elliptizität, also das Verhältnis von Nebenachse zu Hauptachse, ergibt sich für den MOPA-Laser zu 98 % und für den OPO zu 94 %. Die Auswertung der Strahlprofile erfolgte mit der Software „Thorlabs Beam 7.0“.

² Sofern nicht anders angegeben wird für den Strahldurchmesser die $1/e^2$ – Definition benutzt.

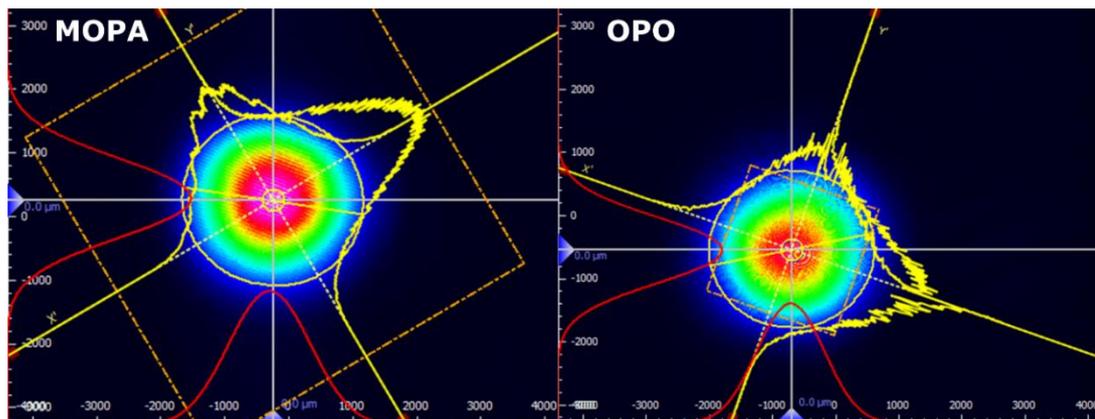


Abbildung 16: Strahlprofile des MOPA-Lasers und des OPOs nach dem Polarisator.

3.1.3 Ergebnisse und Auswertung

Laut Datenblatt gibt der Ultrakurzpulslaser Pulse mit einer Länge von ~ 200 fs bei einer Repetitionsrate von ~ 80 MHz aus [88]. Mit Gleichung 3.4 ergibt sich daraus ein Tastverhältnis von $1,6 \cdot 10^{-5}$. Der aktiv modulierte Faserlaser konnte zu diesem Zeitpunkt Pulse nur bis zu einer minimalen Länge von 500 ps ausgeben. Um damit das gleiche Tastverhältnis zu erhalten, müsste die Repetitionsrate auf 32 kHz eingestellt werden. Da eine so niedrige Repetitionsrate mit diesem Laser noch nicht getestet wurde, wurde die Repetitionsrate für erste Messungen auf 50 kHz eingestellt. Dabei hat sich jedoch schnell herausgestellt, dass eine so niedrige Repetitionsrate für das Datenerfassungssystem des Mikroskops nicht geeignet ist.

In Abbildung 17 sind erste TPEF-Bilder Vergleichsbilder zu sehen. Die Bilder in der linken und mittleren Spalte sind mit dem Faserlaser aufgenommen worden, die Bilder in der rechten Spalte mit dem OPO. Bei dem Bild links wurde die Repetitionsrate auf 50 kHz eingestellt. Während im oberen Bild kaum eine Struktur erkennbar ist, sieht man auf dem darunter angeordneten Bild deutlich, dass die Struktur der Probe unterabgetastet ist und einzelne Streifen sichtbar sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei diesen Aufnahmen die Pixelverweildauer auf $\sim 2,1$ μ s eingestellt war, um eine schnelle Bildaufnahme zu ermöglichen. Somit ist bei einer Anregung mit 50 kHz nur für jeden 10ten Pixel ein Anregungspuls vorhanden. Erhöht man die Repetitionsrate des Lasers auf 400 kHz, so sind die Artefakte bereits reduziert, trotzdem ist das Bild noch nicht so homogen abgetastet, wie dies im Falle des OPOs bei 80 MHz Repetitionsrate sein könnte. Um die beiden Lasersysteme bezüglich der Fluoreszenzintensität vergleichen zu können, musste daher ein Bildgebungsprotokoll gefunden werden, bei dem beide Laser mehrere Anregungspulse pro Pixel abgeben können.

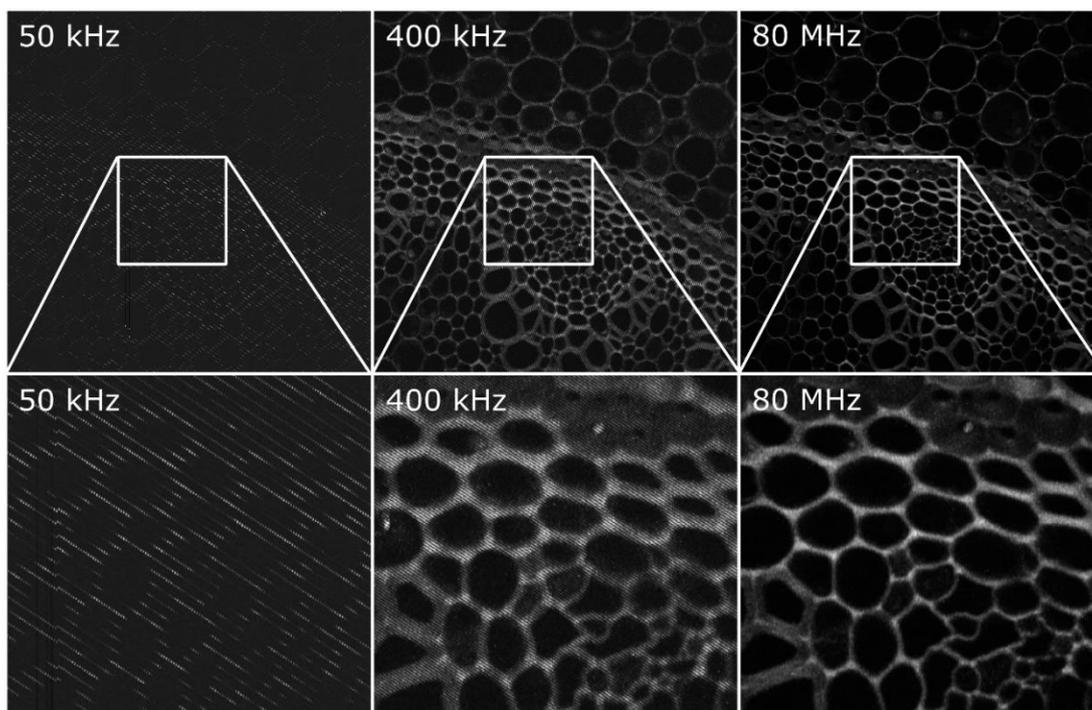


Abbildung 17: Scan-Artefakte bei unterschiedlichen Repetitionsraten. Bei einer Pixelverweildauer von $2 \mu\text{s}$ entstehen Artefakte durch eine zu seltene Anregung bei 50 kHz und 400 kHz Anregung.

Um einen Kompromiss zwischen Aufnahmedauer und Repetitionsrate zu finden, wurde daher der Faserlaser auf eine Repetitionsrate von 400 kHz und die Pixelverweildauer auf $\sim 19 \mu\text{s}$ eingestellt. Da dadurch das Tastverhältnis festgelegt ist und nicht dem des OPOs entspricht, muss die oben getroffene Aussage, dass man die gleiche Bildqualität bei gleichem Tastverhältnis und gleicher CW-Leistung erhält, nochmal betrachtet werden. Aus Gleichung 3.3 folgt, dass die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wird, wenn der Quotient aus CW-Leistung ins Quadrat und Tastverhältnis gleich bleibt:

$$[N_a] = \text{const}, \quad \text{wenn} \quad \left[\frac{P_{\text{avg}}^2}{DC} \right]_{\text{MOPA}} = \left[\frac{P_{\text{avg}}^2}{DC} \right]_{\text{OPO}} \quad 3.6$$

Hat man nun zwei fest vorgegebene Tastverhältnisse, kann man trotzdem die gleiche Anzahl an absorbierten Photonen erreichen, indem man die Leistung entsprechend anpasst. Es ergibt sich somit folgender Zusammenhang der Leistungen:

$$\left[\frac{P_{\text{avg}}^2}{DC} \right]_{\text{MOPA}} = \left[\frac{P_{\text{avg}}^2}{DC} \right]_{\text{OPO}} \Leftrightarrow P_{\text{avg, MOPA}} = P_{\text{avg, OPO}} \sqrt{\frac{DC_{\text{MOPA}}}{DC_{\text{OPO}}}} \quad 3.7$$

Das Tastverhältnis für die Kombination aus 400 kHz Repetitionsrate und 500 ps Pulslänge ergibt sich zu $DC_{\text{MOPA}} = 2 \cdot 10^{-4}$. Somit erhält man mit dem oben berechneten Tastverhältnis des OPOs von $DC_{\text{OPO}} = 1,6 \cdot 10^{-5}$ folgendes Leistungsverhältnis für die die gleiche Anzahl an absorbierten Photonen:

$$P_{\text{avg, MOPA}} = P_{\text{avg, OPO}} \sqrt{\frac{2 \cdot 10^{-4}}{1,6 \cdot 10^{-5}}} = P_{\text{avg, OPO}} \cdot 3,4 \quad 3.8$$

Für die Messungen heißt dies, dass man erst bei der 3,4-fachen CW-Leistung des MOPA-Faserlasers die gleiche Bildqualität wie mit dem OPO erwarten kann.

Abbildung 18 zeigt Aufnahmen der oben erwähnten Maiglöckchenprobe mit einer Anregung bei 1064 nm. In der Mitte ist die Aufnahme mit 25 mW OPO Anregeleistung dargestellt. Die Helligkeit der Bilder gibt die TPEF-Intensität an und die lineare Intensitätsskalierung ist in allen drei Bildern identisch. Links und rechts neben der OPO-Aufnahme sind die Aufnahmen mit dem MOPA-Faserlaser zum Vergleich angeordnet. Einmal mit der 3,4-fachen Anregeleistung von ~ 85 mW, bei der man die gleiche Bildqualität erwarten würde wie mit dem OPO, auf der linken Seite und einmal mit 135 mW Anregeleistung auf der rechten Seite. Es ist klar zu erkennen, dass die Helligkeit im linken Bild deutlich geringer ist, als im mittleren Bild. Das bedeutet, dass die TPEF-Intensität mit der MOPA-Faserlaser Anregung geringer ist, als erwartet. Um subjektiv die gleiche Helligkeit zu erhalten, musste die Leistung von 85 mW auf 135 mW erhöht werden. Um diesen Eindruck quantifizieren zu können, wurden Bereiche im Bild ausgewählt, in denen die Intensität zwischen den Bildern verglichen werden.

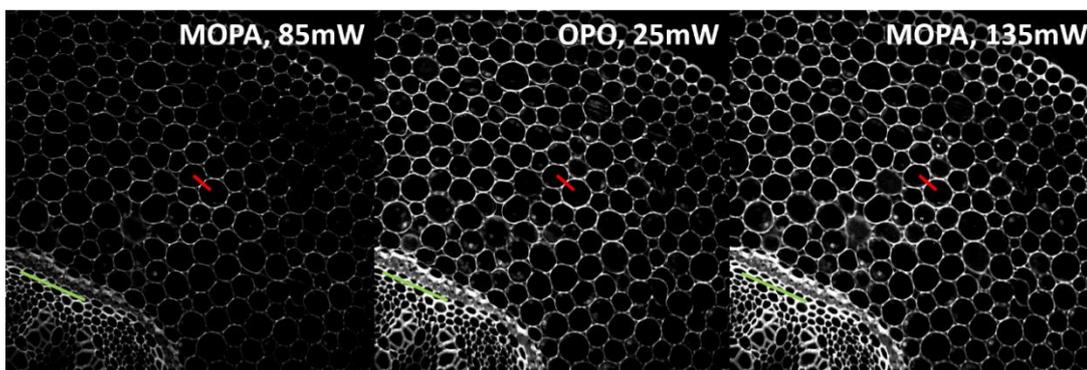


Abbildung 18: TPEF-Intensitätsvergleich zwischen OPO und MOPA Laser bei unterschiedlichen Leistungen.

In den drei Bildern in Abbildung 18 sind jeweils eine rote und eine grüne Linie eingezeichnet. An diesen Stellen wird die Intensität der Signale untereinander verglichen. Das Intensitätsprofil für die rote Linie ist in Abbildung 19 dargestellt und

das Profil für die grüne Linie in Abbildung 20. Man erkennt an diesen Intensitätsprofilen drei Dinge. Erstens sind die Strukturen für die Anregung mit 85 mW schmaler als für die beiden anderen Varianten. Zweitens ist das Signal mit 85 mW Anregung nur ca. 2/3 so groß, wie mit der OPO-Referenzanregung mit 25 mW. Drittens, die Intensität ist für die MOPA-Anregung mit 135 mW durchwegs höher, als in der OPO-Vergleichsmessung und die Strukturen sind ähnlich breit. Diese Unterschiede können unterschiedliche Ursachen haben, die im Folgenden kurz diskutiert werden.

Die Tatsache, dass die Strukturen teilweise unterschiedliche Dicken aufweisen, liegt wahrscheinlich daran, dass die Aufnahmen aus leicht verschiedenen Tiefen stammen und die Probe in diesen Tiefen eine andere Breite aufweist. Da zwischen den Messungen zumindest der magnetisch gehaltete Spiegel entfernt oder eingebracht wurde, kann es durchaus sein, dass sich die Probenhalterung in dieser Zeit leicht bewegt hat. Eine zweite Möglichkeit für unterschiedliche Breiten der Struktur könnte eine mögliche Anregung auch außerhalb des Fokusvolumens sein. Ist die Pulsenergie nämlich so hoch, dass man die Fluorophore innerhalb des Fokusvolumens sättigt, so bedeutet dies auch, dass man außerhalb des Fokusvolumens noch genügend Intensität hat, um Fluorophore anzuregen. Obwohl dies eine Problematik ist, die durchaus näher betrachtet werden muss, kann dies an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Da die Strukturen für die Anregung mit dem Ultrakurzpulslaser und dem MOPA-Faserlaser mit 135 mW Leistung gleich groß sind, sich die Pulsenergien jedoch um ca. 3 Größenordnungen unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass Sättigung hier nicht zu einer Verbreiterung der Strukturen führt. Somit ist die Annahme, dass sich die Probe während der Messung leicht bewegt hat, die plausibelste.

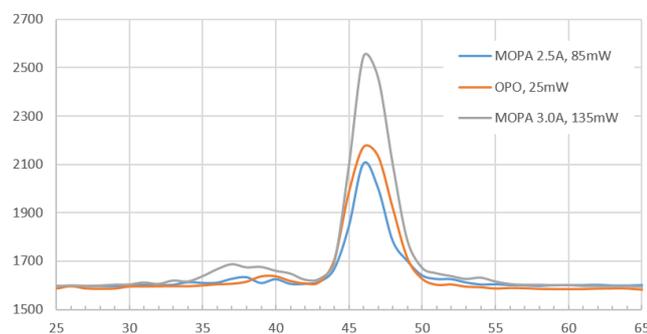


Abbildung 19: Intensitätsprofil zu Abbildung 18 rote Linie

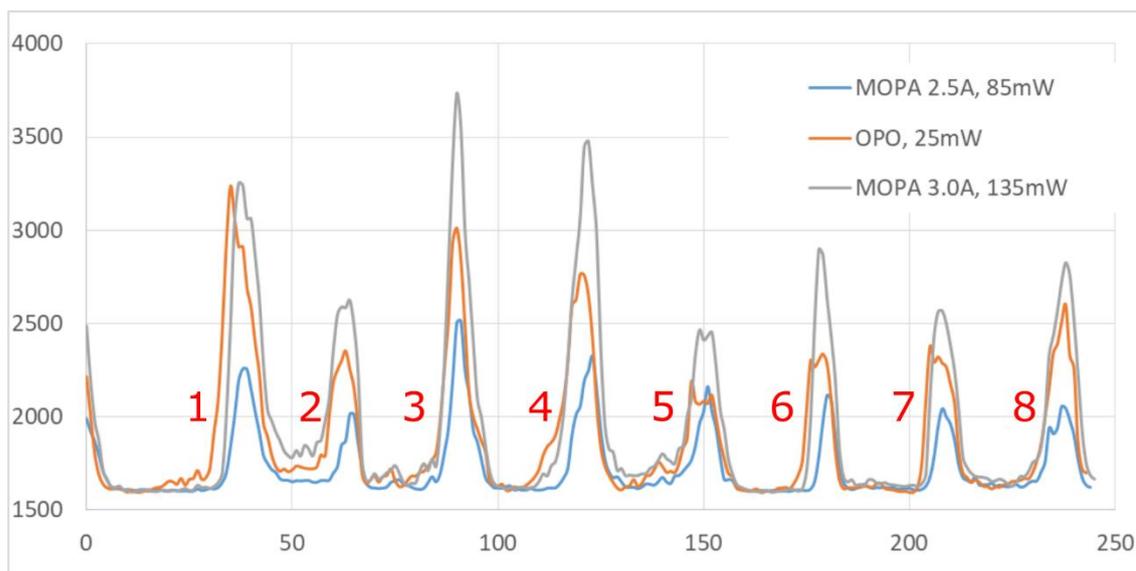


Abbildung 20: Intensitätsprofil zu Abbildung 18 grüne Linie

Die unterschiedlichen Intensitäten für die Anregung mit dem OPO bei 25 mW Leistung und dem MOPA-Faserlaser mit 85 mW Leistung widersprechen der obigen Aussage, dass man bei gleichem Verhältnis von Anregungsleistung ins Quadrat zu Tastverhältnis auch die gleiche Bildqualität erwarten kann. Deshalb wird dieser Sachverhalt nochmal näher betrachtet.

Die Angabe für die Pulsdauer von 200 fs für den OPO stammt vom Hersteller und stellt eine obere Grenze dar [88]. Das bedeutet, dass die Pulse unter Umständen auch kürzer sein können. Leider war es im Zuge der TPEF-Aufnahmen nicht möglich, die Pulsdauer zu bestimmen. Laut persönlicher Kommunikation [97] ist bei der Einrichtung des Lasers jedoch eine Pulslänge von 140 fs für Pulse aus dem OPO gemessen worden. Das würde ein Tastverhältnis von $DC_{\text{OPO}} = 1,12 \cdot 10^{-5}$ statt der oben angegebenen $DC_{\text{OPO}} = 1,6 \cdot 10^{-5}$ ergeben. Mit diesem Wert für das Tastverhältnis können die Intensitätswerte erneut in Bezug zueinander gesetzt werden und die Aussage ohne weitere Messung überprüft werden. Wenn der Zusammenhang, wie in Gleichung 3.6 dargestellt, valide ist, sollte für alle Anregungsparameter das Produkt aus dem Systemparameter S und der Pixelverweildauer t_{px} gleich sein. Aus Gleichung 3.3 folgt somit:

$$\frac{N_a \cdot DC}{P_{\text{avg}}^2} = S \cdot t_{\text{px}} = \text{const} \quad 3.9$$

Tabelle 1: Auswertung zum Zusammenhang von Intensität, Leistung und Tastverhältnis

Bereich	Intensität [counts]			„System“ – Parameter [a.u.]			Verhältnis „S“- Parameter OPO zu:	
	MOPA 135mW	MOPA 85mW	OPO 25mW	MOPA 135mW	MOPA 85mW	OPO 25mW	MOPA 135mW	MOPA 85mW
1	1639	654	1636	5.0E+04	4.9E+04	3.4E+04	0.69	0.69
2	1024	412	700	7.9E+04	7.8E+04	8.0E+04	1.00	1.02
3	2133	915	1412	3.8E+04	3.5E+04	4.0E+04	1.04	1.12
4	1878	724	1157	4.3E+04	4.5E+04	4.8E+04	1.11	1.08
5	834	562	516	9.8E+04	5.7E+04	1.1E+05	1.11	1.88
6	1265	490	737	6.4E+04	6.6E+04	7.6E+04	1.18	1.15
7	968	443	721	8.4E+04	7.3E+04	7.7E+04	0.92	1.06
8	1226	445	1000	6.6E+04	7.2E+04	5.6E+04	0.84	0.77
							0.99	1.10

Um nun diese Aussage zu überprüfen wurden die Intensitäten der 8 Maxima aus Abbildung 20 bestimmt und mit dem jeweiligen Tastverhältnis und der CW-Leistung gemäß Gleichung 3.9 für die jeweiligen Konfigurationen ins Verhältnis gesetzt. Der Systemparameter S unterscheidet sich für die unterschiedlichen Maxima, da in den Anregungsvolumina unterschiedlich viele Fluorophore vorkommen können. Die entsprechende Auswertung ist in Tabelle 1 aufgeführt. Die Auswertung ergibt eine weitgehende Übereinstimmung des Systemparameters für die Anregung mit 130 mW MOPA-Faserlaser und OPO Anregung. Für die MOPA-Anregung mit 85 mW erhält man durchwegs einen etwas größeren Systemparameter, im Mittel 10% über dem Wert für MOPA 135 mW und OPO Anregung, was dafür spricht, dass die Anregung nicht so effizient ist. Da man aber bereits in den Bildern gesehen hat, dass die Strukturen etwas unterschiedlich waren, liegt dies vermutlich daran, dass leicht unterschiedliche Strukturen angeregt wurden. Die hervorragende Übereinstimmung von im Mittel 99% für die Anregung mit 25 mW OPO Leistung und 135 mW MOPA Leistung zeigt letztendlich die Validität der obigen Aussagen, dass man bei gleicher Anregeleistung und Tastverhältnis die gleiche Fluoreszenzintensität erwarten kann.

Da es bei der Bildgebung immer auch um den subjektiven visuellen Eindruck geht, werden an dieser Stelle die Aufnahmen qualitativ verglichen. Abbildung 21 zeigt die Aufnahmen aus Abbildung 18, mit einer anderen Farbgebung dargestellt. d) – f) zeigen die gleiche lineare Transformation der Intensitätswerte, wie in Abbildung 18. Für die Bilder a) – c) wurde dem Programm Irfanview eine automatische Anpassung des Intensitäts-zu-Farbgebung Mapping durchgeführt. Der subjektive Eindruck der Bilder ist dann für alle drei Bilder gleich. Dies ist auch in einer direkten

Gegenüberstellung der Bilder a) und b) zu sehen, welche in Abbildung 22 dargestellt ist.

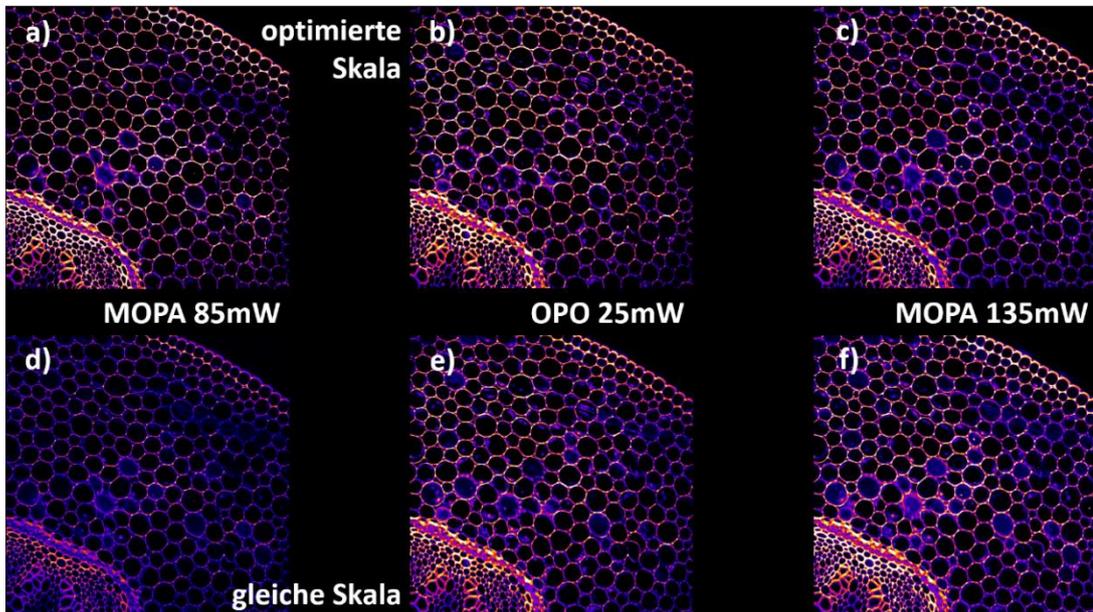


Abbildung 21: Qualitativer TPEF-Intensitätsvergleich zwischen Anregung mit ultra-kurzen Pulsen (OPO) und Sub-Nanosekunden Pulsen (MOPA) bei verschiedenen Leistungen.

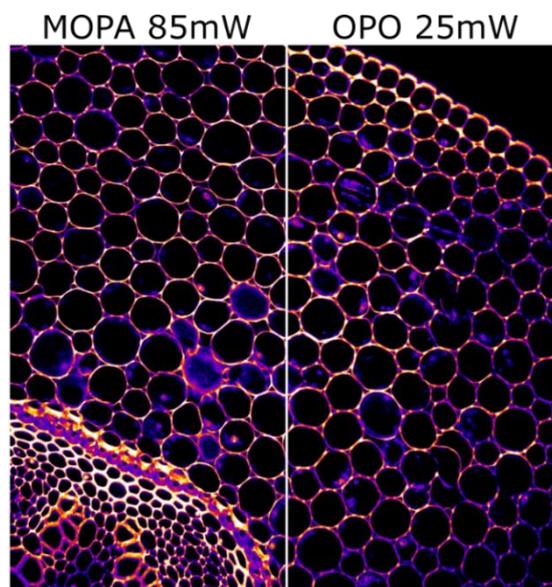


Abbildung 22: Nebeneinander gestellte TPEF-Aufnahmen mit OPO und MOPA Anregung mit vergleichbaren Leistungen.

3.1.4 Fazit Vergleich Ultrakurzpuls laser mit Sub-Nanosekunden Laser

Zusammenfassend kann somit geschlossen werden, dass beide Lasersysteme, der Sub-Nanosekunden Faserlaser und der Ultrakurzpuls laser, für die TPEF-Mikroskopie geeignet sind. Die theoretische Überlegung, dass bei gleicher Anregeleistung und gleichem Tastverhältnis, die gleiche Bildqualität erreicht wird, konnte indirekt nachgewiesen werden. Leider war es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, an diesem Mikroskopiesystem das gleiche Tastverhältnis für beide Laser einzustellen. In der weiteren Entwicklung der Faserlichtquelle sollte deshalb noch ein Fokus auf die möglichen Tastverhältnisse gelegt werden. Die weiteren theoretischen Überlegungen bezüglich Effekten, die neben der Zweiphotonenabsorption eine Rolle spielen, haben gezeigt, dass die Anregung mit deutlich längeren Pulsen sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben kann. Um weitere Aussagen über die Biokompatibilität der Sub-Nanosekunden Pulse treffen zu können, müssen die angesprochenen Effekte experimentell untersucht werden.

Die gewonnenen Erfahrungen im Zusammenhang mit der Multiphotonenbildung mit beiden Lichtquellen haben gezeigt, dass der günstige und robuste Faserlaser eine vielversprechende Anregungslichtquelle darstellt.

3.2 Entwicklung und Aufbau eines Eigenbau Multiphotonenmikroskops

Die gewonnenen Erfahrungen beim Vergleich des MOPA-Faserlasers mit einem Ultrakurzpulslaser haben deutlich gemacht, dass auch mit Sub-Nanosekunden Pulsen Zwei-Photonen Bildgebung möglich ist. Um die Laserquelle weiter für diesen Einsatzzweck hin untersuchen zu können, wurde ein eigenes Multiphotonenmikroskop aufgebaut. Der Eigenbau erlaubt es, ein möglichst offenes und flexibles Mikroskop zu entwickeln. Neben der optimalen Anpassbarkeit war ein weiterer wichtiger Grund für die Eigenentwicklung, Erfahrung im gesamten Bereich der Multiphotonenbildgebung zu sammeln.

Der Aufbau kann grob in drei Bereiche untergliedert werden. A) die Lichtquelle, B) die optische Auslegung und C) die Datenerfassung und Synchronisierung. In diesem Abschnitt werden die Bereiche B) und C) näher beschrieben. Details zur Lichtquelle wurden bereits in den vorherigen Kapiteln gegeben.

3.2.1 Optische Auslegung des Multiphotonenmikroskops

Die Aufgabe des optischen Aufbaus ist es, das Anregungslicht des Lasers beugungsbegrenzt und stark fokussiert über die Probe zu scannen und das resultierende Fluoreszenzlicht auf den Detektor zu lenken.

Es gibt bereits eine Vielzahl an Veröffentlichungen, die sich mit dieser Aufgabenstellung beschäftigen haben und Anleitungen zum Bau eines Multiphotonenmikroskops geben [98-101]. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein für unsere Anforderungen passendes Design von Mayerhofer et al. [98] als Grundlage benutzt und an unsere Bedürfnisse angepasst. Abbildung 23 zeigt eine Skizze des realisierten Aufbaus. Das Licht aus der Faser wird kollimiert und mit galvanometrischen Spiegeln abgelenkt. Der Drehpunkt, auch Pivot-Punkt genannt, der galvanometrischen Spiegel wird mit einer Relay-Optik in die rückwärtige Apertur des Objektivs abgebildet. Dort werden unterschiedliche Winkel in unterschiedliche Ortspunkte auf der Probe übersetzt um selbige Punkt für Punkt abzuscannen. Das Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv aufgesammelt und hinter dem Objektiv mit einem dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt und auf den Detektor gelenkt.

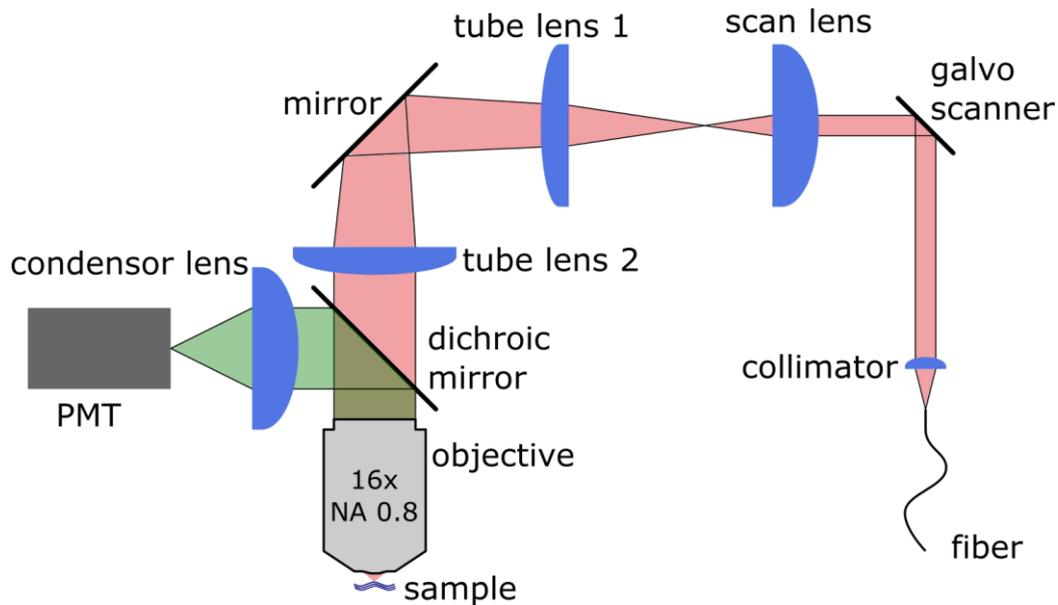


Abbildung 23: Schematischer Aufbau des Selbstbau-Multiphotonenmikroskops. Das Anregelicht wird aus der Faser ausgekoppelt und auf galvanometrische Spiegel gelenkt. Eine Kombination aus Scan- und Tubuslinsen bildet den Drehpunkt dieser Spiegel in die rückwärtige Apertur des Objektivs ab. Dort wird das Licht auf die Probe fokussiert und das resultierende Fluoreszenzlicht auf dem Weg zurück mit einem dichroitischen Spiegel auf den Detektor gelenkt.

Die Auswahl der Linsen erfolgte dabei unter dem Gesichtspunkt, möglichst wenige Abbildungsfehler auch bei großen Scanwinkeln zu erhalten. Es hat sich gezeigt, dass große Linsen mit langen Brennweiten weniger Abbildungsfehler erzeugen, als kleine Linsen mit kurzen Brennweiten [102]. Die Kollimatorlinse (collimator, C280TME-1064, Thorlabs) mit einer Brennweite von 18,6 mm erzeugt einen kollimierten Strahl mit einem Durchmesser von 4,1 mm. Dieser Strahl wird mit zwei nahe beieinander liegenden galvanometrischen Spiegeln (galvo scanner, GVS002, Thorlabs) abgelenkt. Der Punkt zwischen den Spiegeln wird mit der erwähnten Relay-Optik in die rückwärtige Apertur des Objektivs abgebildet. Für diese Abbildung wurden 2" Optiken mit langen Brennweiten verwendet, um Abbildungsfehler zu minimieren. Die Scanlinse (scan lens, AC508-075-C-ML, Thorlabs) hat eine Brennweite von 75 mm und eine Kombination aus einer 300 mm (tube lens 1) und einer 400 mm (tube lens 2) Linse (AC508-300-C-ML, AC508-400-C-ML, Thorlabs) dient als Tubuslinse. Die Kombination von Scanlinse und Tubuslinse fungiert außerdem als Teleskop um den Strahl aufzuweiten. Mit dieser Kombination und einem gewählten Abstand von 125 mm zwischen den Linsen erhält man eine Vergrößerung um einen Faktor 2,8 bzw. einen Strahldurchmesser von 12,3 mm vor dem Objektiv. Um einen beugungsbegrenzten Spot auf der Probe zu erzeugen, muss das Objektiv überstrahlt werden [103]. Durch das Überstrahlen verliert man jedoch Leistung, die nicht auf die Probe fokussiert wird. Bei einem Aperturdurchmesser von ~ 10 mm,

ist der Strahldurchmesser von 12,3 mm deshalb ein Kompromiss zwischen Auflösung und Leistungsverlust. Das verwendete Objektiv (objective, CFI75 LWD 16xW, Nikon) hat eine numerische Apertur von 0,8 bei einer 16-fachen Vergrößerung. Damit ergibt sich in der Fokusebene ein rechnerischer Strahlradius von 420 nm für den $1/e^2$ – Intensitätsabfall (berechnet nach [104]).

Während die Linsen für die verwendeten Wellenlängen im Nahinfraroten mit einer Antireflexoberfläche beschichtet sind, trifft dies für das Objektiv nicht zu. Das bedeutet, dass man durch vielfache Reflexe im Objektiv Lichtleistung für die Anregung verliert. Insgesamt wurde eine Transmission von 46 % vom Kollimator bis zur Fokusebene gemessen. Wie in Abbildung 23 weiter zu sehen, teilt auf dem Rückweg der dichroitische Spiegel (dichroic mirror, DMLP950R, Thorlabs) das Anregelicht vom Fluoreszenzlicht und lenkt letzteres in Richtung des Detektors ab. Eine Kondensorlinse vor dem Photomultiplier (PMT, H12056-20, Hamamatsu) konzentriert das Fluoreszenzlicht auf die Detektorfläche. Um das Anregungslicht noch weiter zu unterdrücken, ist vor dem PMT ein optischer Kurzpassfilter angebracht (SP1000 OD2, Edmund Optics). Der gesamte optische Aufbau ist eingehaust und abgedunkelt, um Streulicht zu unterdrücken.

Da die erreichbare optische Auflösung eine wichtige Kenngröße für das Mikroskop ist, wird diese an dieser Stelle nochmal genauer betrachtet. Mit dem oben angegebenen Strahlradius für den $1/e^2$ – Intensitätsabfall kann nämlich noch nicht direkt eine Aussage über die Auflösung im Fall der Zweiphotonenabsorption gemacht werden. Typische Definitionen für die Auflösung verwenden statt des Strahlradius entweder das Rayleigh-Kriterium oder die Halbwertsbreite des Anregungsspot. Das Rayleigh Kriterium besagt, dass man zwei Punkte gerade noch voneinander unterscheiden kann, wenn das Intensitätsmaximum des einen Punkts auf das erste Beugungsminimum des zweiten Punkts fällt [105]. Da man dieses Kriterium nicht einfach experimentell nachweisen kann und die Breite des Hauptmaximums d_{FWHM} in etwa dem Abstand des ersten Minimums d_{Rayleigh} entspricht, wird oft statt des Rayleigh-Kriteriums die Halbwertsbreite der Punktspreizfunktion der Abbildung als Auflösungsgrenze angegeben [105]. Abschätzungen für diese Werte für den Fall einer runden Aperturblende und einer homogenen Ausleuchtung selbiger sind:

$$d_{\text{FWHM}} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA}, \quad d_{\text{Rayleigh}} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad 3.10$$

Da die Wahrscheinlichkeit für eine Zweiphotonenabsorption quadratisch von der Intensität abhängt, ist die erreichbare Auflösung durch die Breite der quadrierten Intensitätsverteilung des Anregungsspot gegeben [10, 106]. Nähert man die Beugungsmuster mit einem gaußförmigen Intensitätsprofil an, so ergibt sich eine

Reduktion der Werte um einen Faktor $1/\sqrt{2}$ im Vergleich zum oben dargestellten Fall. Die Halbwertsbreite der quadrierten Punktspreizfunktion berechnet sich somit zu:

$$d_{\text{FWHM}}^{2P} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot NA} \quad 3.11$$

Damit erhält man eine theoretisch erreichbare Auflösung von $d_{\text{FWHM}}^{2P} = 480$ nm bei einer Wellenlänge von 1064 nm und einer NA von 0,8. Die hier dargestellte Berechnung der Auflösung folgt qualitativen Überlegungen und nähert die Punktspreizfunktion als gaußförmige Funktion an. Folgt man der ausführlichen Betrachtung von [10, 106], so erhält man einen Ausdruck für den 1/e Radius $\omega_{x,y}$ der quadrierten Punktspreizfunktion der Beleuchtung von:

$$\omega_{x,y} = \begin{cases} \frac{0,32 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot NA}, & NA < 0,7 \\ \frac{0,325 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot NA^{0,91}}, & NA \geq 0,7 \end{cases} \quad 3.12$$

Multipliziert man diesen Ausdruck mit einem Korrekturfaktor von $2/\sqrt{\ln 2}$, so erhält man aus diesem 1/e Radius die Halbwertsbreite, mit der oben die Auflösung definiert wurde. Mit letzterer Betrachtung ergibt sich eine theoretische Auflösung von $d_{\text{FWHM}}^{2P} = 500$ nm. Sowohl die qualitativen Überlegungen, als auch die ausführliche mathematische Betrachtung der Auflösung liefern maximal erreichbare Auflösungen von ~ 500 nm. Zu beachten ist jedoch, dass die Auflösung durch zwei Faktoren deutlich verschlechtert werden kann. Zum einen wird die Multiphotonenmikroskopie vor allem in tieferliegenden Schichten von stark streuendem Gewebe eingesetzt. Beim Durchlaufen von Gewebeschichten vor der Fokusebene wird dabei die Wellenfront des Anregespots beeinträchtigt und eine perfekte Fokussierung des Lichts ist dann nicht mehr möglich. Wie in Kapitel 3.1.3 angesprochen, ist es außerdem möglich, dass eine Sättigung der Fluorophoranregung stattfindet und somit das Anregenvolumen deutlich größer ist, als theoretisch berechnet [10].

Der beschriebene optische Aufbau erlaubt es somit, das Anregelicht auf verschiedene Punkte auf die Probe zu fokussieren und das resultierende Fluoreszenzlicht aufzusammeln. Im nächsten Schritt muss dieses Licht detektiert und digitalisiert werden.

3.2.2 Datenerfassung und Synchronisierung des Selbstbau-Multiphotonenmikroskops

Unter Datenerfassung und Synchronisation versteht man alle Komponenten, die dafür zuständig sind, dass aus dem durch den Anregelaser erzeugte Fluoreszenzlicht ein Bild der Probe entstehen kann. Dazu wird das in der Probe erzeugte Fluoreszenzlicht mit einem geeigneten Detektor erfasst und in eine Spannung umgewandelt. Diese Spannungsamplitude wird digitalisiert und ist ein Maß für die Signalintensität³. Übersetzt man diese Intensität in eine Farbe oder Helligkeit und ordnet man sie einem Ort auf der Probe zu, so erhält man ein Fluoreszenzbild der Probe. In diesem Unterkapitel werden nun diese einzelnen Schritte näher betrachtet.

Die Digitalisierung des Signals beginnt im Photodetektor mit der Umwandlung des optischen Signals in ein elektrisches. Da man sehr wenig Licht detektieren möchte, werden besonders sensitive Detektoren verwendet. Eine Übersicht über verschiedene Detektoren bieten [10, 107, 108]. In diesem Aufbau wurde ein Multi-Alkali-Photomultiplier (engl. photomultiplier tube, PMT) mit erweiterter Sensitivität im Nahinfrarotem verwendet (H12056-20, Hamamatsu). Dieser PMT erreicht eine Quanteneffizienz bei Licht mit 600 nm von $\eta_{\text{PMT}} \sim 16\%$ und bei typischen Dynodenspannungen eine Elektronenvervielfachung um $g_{\text{PMT}} \sim 8 \cdot 10^5$. Der PMT erreicht eine Anstiegszeit von $\tau_{\text{rise}} \sim 600$ ps und ist mit einem 50 Ohm Widerstand abgeschlossen, um diese kurze Anstiegszeit nicht durch die Kapazität eines angeschlossenen Kabels zu verlängern. Der abgeschlossene Ausgang des PMTs ist mit einer schnellen analog-zu-digital Wandlerkarte (engl. analog-to-digital converter, ADC) verbunden. Die verwendete Karte (ATS9373, Alazartech) ist ebenfalls mit 50 Ohm abgeschlossen, hat eine analoge Bandbreite von 2 GHz und löst die Spannung in einem Bereich von ± 400 mV mit 12 Bit bei einer Samplerate von 4 GS/s auf. Mit einem speziellen Datenpackverfahren und einem Datendurchsatz von bis zu 6,8 GByte/s ist es möglich, die aufgenommenen Daten kontinuierlich in den Arbeitsspeicher des Datenerfassungscomputers zu transferieren. Die Kombination aus dem verwendeten PMT und der verwendeten ADC-Karte bestimmen bereits wichtige Kenngrößen der Digitalisierung. Mit der obigen Verstärkung erzeugt ein Einzelphotonenevent eine Ladung von $q = e \cdot g_{\text{PMT}} \sim 1,2 \cdot 10^{-13}$ As. Wobei e die Elementarladung ist. Fließt diese Ladung über ein typisches, vom PMT bestimmtes Zeitfenster von $\tau_{\text{Gate}} \sim 1$ ns ab, so ergibt sich ein Strom von $I = q/\tau \sim 128$ μ A. Dieser Strom ergibt am Abschlusswiderstand der ADC-Karte, welcher parallel geschaltet ist zum PMT

³ Die analoge Detektion ist weit verbreitet. Ohne auf Details einzugehen, sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass es auch eine digitale Detektionsvariante gibt, bei der einzelne Photonen gezählt werden.

Abschlusswiderstand, eine mittlere Spannungsamplitude von $U=R \cdot I \sim 3,2 \text{ mV}$ für ein Einzelphotonenevent. Unter der Annahme, dass der PMT eine lineare Signalantwort auf eine Vielzahl von Photonen gibt, können somit ca. 100 Photonen pro Zeitfenster erfasst werden.

Neben der Digitalisierung des optischen Signals ist der zweite wichtige Punkt in der Datenerfassung die Zuordnung des Signals zu einem Ortspunkt. Um dies zu erreichen, muss die Ablenkung der galvanometrischen Spiegel mit der Datenerfassung synchronisiert werden. Während viele Multiphotonenmikroskop Implementierungen ausschließlich diese beiden Komponenten synchronisieren, wird hier zusätzlich auch der Anregelaser mit der Datenerfassung synchronisiert. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass der Zeitpunkt, zu dem das Signal erwartet wird, exakt bestimmt werden kann und die Digitalisierung nur die Datenpunkte auswählt, bei denen ein Signal erwartet wird. Dadurch kann effektiv Dunkelstrom und Umgebungslicht unterdrückt werden. Außerdem werden damit die in Kapitel 3.1 beschriebenen streifenartige Bildartefakte vermieden.

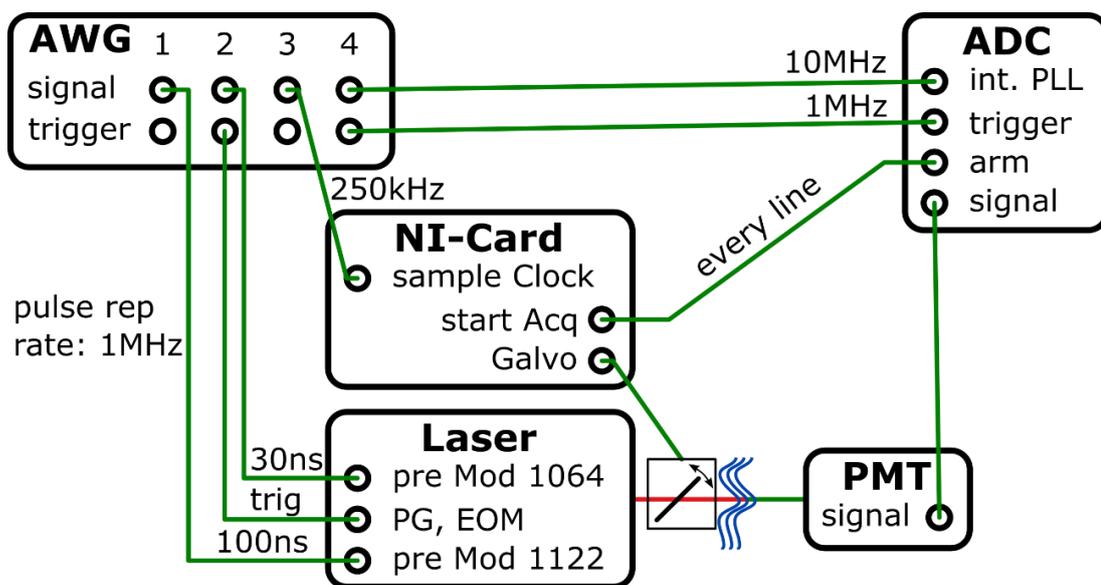


Abbildung 24: Synchronisation Zwei-Photonen Mikroskop. Der zentrale Funktionsgenerator (AWG) synchronisiert alle Komponenten.

Die Synchronisation ist schematisch in Abbildung 24 dargestellt. Angaben in Klammer im folgenden Absatz beziehen sich auf die im Bild verwendeten Abkürzungen. Die zentrale Komponente ist dabei ein Arbiträr-funktionsgenerator (engl. arbitrary waveform generator, AWG), der sowohl Trigger-, als auch Taktreferenzsignale für alle Komponenten ausgibt. Dieser Vier-Kanal-AWG (TGA12104, TTI) mit einer Abtastrate von 100 MS/s hat eine feste Phasenbeziehung zwischen den Kanälen und selbst erstellte Wellenformen stellen die unterschiedlichen Signale bereit. Dabei

kann zu jedem der vier analogen Ausgänge ein digitales Signal ausgegeben werden. Ein Teil der Kanäle wird für die Ansteuerung des Lasers benutzt. Dieser erhält Triggersignale für die Vormodulation (pre Mod) der Seed-Laserdioden und ein Triggersignal für die Erzeugung des kurzen Pulses im Pulsgeneratur (PG). Ein Kanal gibt ein Taktreferenzsignal (sample clock) für die digitale IO-Karte (NI-Card, NI-PCI-6285, National Instruments) aus, welche die galvanometrischen Spiegel ansteuert und ein Synchronisationssignal (start Acq) für die AD-Karte ausgibt. Zwei weitere Kanäle dienen der Synchronisation der AD-Karte. Davon stellt einer ein 10 MHz Taktreferenzsignal bereit, das mit einer internen Phasenregelschleife (engl. phase-locked-loop, PLL) auf eine Frequenz von 2 GHz vervielfacht wird. Die steigende und die fallende Flanke dieses 2 GHz Signals dient dabei als Datenerfassungstakt, womit eine Erfassungsrates von 4 GSample/s möglich ist. Der zweite Kanal aus dem AWG für die AD-Karte gibt ein mit den Anregepulsen synchrones Signal aus, das als Datenerfassungstrigger dient. In der AD-Karte selbst werden die Triggersignale (trigger und arm) mit einem logischen AND verknüpft, so dass die Datenerfassung nur startet, wenn die IO-Karte Steuersignale an die Spiegel ausgibt und ein Anregepuls vorhanden ist.

Diese Art der Synchronisation erlaubt es, eine AD-Karte mit einer hohen analogen Bandbreite zu nutzen, ohne dass das Signal durch elektronisches Rauschen überlagert wird, da nur zum Zeitpunkt der Anregung Datenpunkte ausgewertet werden. Außerdem hat sich gezeigt, dass durch die Synchronisation von Laser und Datenerfassungskarte direkt Fluoreszenzlebenszeiten bestimmt werden können. Dies wird ausführlicher in Kapitel 4 beschrieben.

Die Ansteuerung der galvanometrischen Spiegel und die Auswertung der Daten ist mit der Programmierumgebung LabView (National Instruments) realisiert worden. Damit ist es nun möglich, Multi-Photonen Bilder aufzunehmen.

3.3 Multiphotonenmikroskopie mit 1064 nm Anregung am Eigenbaumikroskop

Der oben beschriebene Aufbau soll als flexible Bildgebungsplattform für Multiphotonenmikroskopie dienen, um verschiedene Bildgebungsmodalitäten und Anregungslichtquellen zu testen. In diesem Unterkapitel wird dieser Aufbau nun mit Multiphotonenbildung mit einer Anregung bei 1064 nm charakterisiert. Dabei sollen Aufnahmen mit TPEF und SHG (eng. second harmonic generation) Kontrast aufgenommen und qualitativ bewertet werden.

3.3.1 TPEF – Bildgebung an einem *Convallaria majalis* Pflanzenstängel

Als Standardprobe für die meisten Experimente, wie auch schon in Kapitel 3.1, wurde ein eingefärbter Pflanzenschnitt eines Maiglöckchens (*Convallaria majalis*, Lieder GmbH) benutzt. Der Schnitt durch den Pflanzenstängel ist mit Acredin-Orange gefärbt. Obwohl der Farbstoff sein Absorptionsmaximum bei einer Ein-Photonen Anregung bei ~ 500 nm [109] hat, ist diese Probe auch gut für eine Anregung bei 1064 nm geeignet [84]. Abbildung 25 zeigt Lichtmikroskopiebilder der verwendeten Probe. In a) ist der gesamte Schnitt zu erkennen, b) – f) zeigen Ausschnitte mit einer größeren Auflösung. Diese Aufnahmen dienen an dieser Stelle als qualitative Vergleichsbilder.

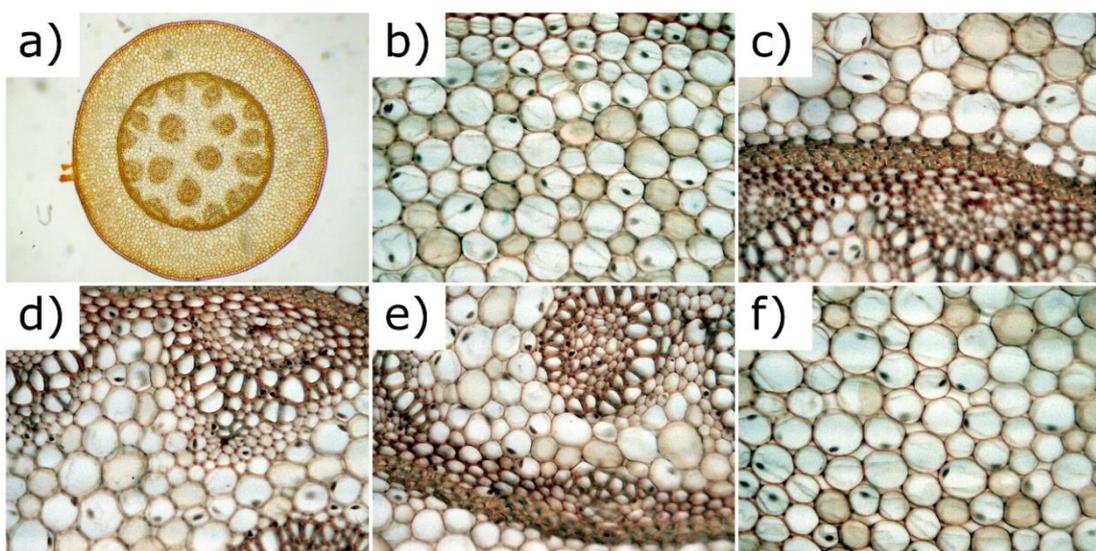


Abbildung 25: Lichtmikroskopiebilder der verwendeten *Convallaria* Probe.

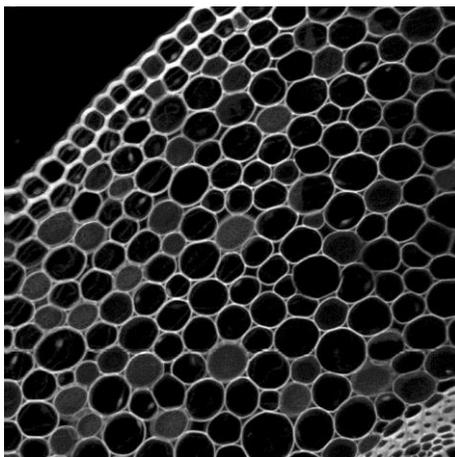


Abbildung 26: TPEF-Aufnahme der verwendeten Convallaria Probe.

Eine TPEF-Aufnahme derselben Probe ist in Abbildung 26 zu sehen. Die Anregeleistung bei 1064 nm betrug ~ 25 mW auf der Probe bei 200 kHz Repetitionsrate und einer Pulslänge von 560 ps. Bei dieser ungemittelten Aufnahme mit einer Größe von 1024×1024 Pixel betrug die Pixelverweildauer $5 \mu\text{s}$ und die Gesamtaufnahmedauer somit etwas mehr als 5 s.

Um diesem Bild eine Größenskalierung geben zu können, wurde die Probe mit einem Lineartisch in eine Richtung um einen definierten Weg verschoben und die Position von zwei markanten Punkten in dem nicht verschobenen Bild und dem verschobenen Bild verglichen. Abbildung 27 zeigt die beiden um $300 \mu\text{m}$ verschobenen Aufnahmen. Dabei wurde eine Spannungsamplitude von jeweils 4 V an beide Scannerachsen angelegt. Mit einem Versatz von 540 Pixeln pro $300 \mu\text{m}$ Verfahrensweg ergeben sich eine Pixelgröße von 555 nm/px und eine Gesamtbreite des Bildes von $570 \mu\text{m}$. Für Aufnahmen mit gleichen Parametern kann somit direkt eine Größenskalierung angegeben werden.

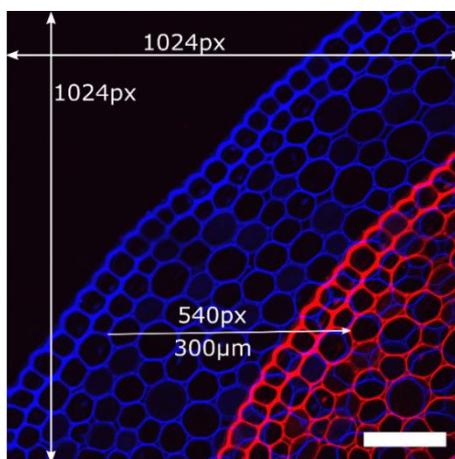


Abbildung 27: Verschobene Aufnahme für Größenskalierung. Skalierungsbalken $100 \mu\text{m}$.

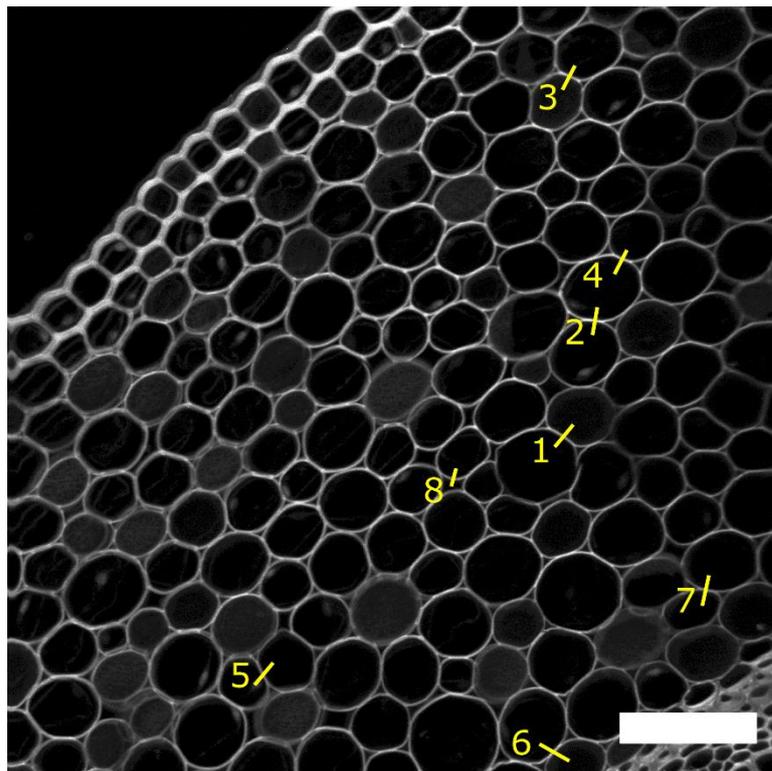


Abbildung 28: Convallaria Aufnahme mit 2048×2048 Pixel für eine Abschätzung der Auflösung. Skalierungsbalken 100µm.

Die gleiche Kalibrierung wurde mit einer Bildgröße von 2048×2048 Pixel vorgenommen. Das zugehörige Bild ist in Abbildung 28 dargestellt. Der Skalierungsfaktor ergab sich hier zu 275 nm/px. Mit dieser dichter abgetasteten Aufnahme wurde zusätzlich eine Abschätzung der optischen Auflösung vorgenommen. Dazu wurde die Halbwertsbreite von dünnen Strukturen in der Probe analysiert. Die Stellen, an denen eine Analyse vorgenommen wurde, sind in Abbildung 28 gelb markiert. In Abbildung 29 sind die zugehörigen Intensitätsprofile in schwarz und entsprechenden Gauß-Fits in rot dargestellt. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Fits sind in Tabelle 2 ausgewertet. Der Mittelwert der acht Messungen beträgt 1,8 µm. Dieser Wert könnte sowohl durch die Struktur, als auch durch die optische Auflösung des Mikroskops bestimmt sein, er stellt jedoch eine obere Grenze für die Auflösung des gesamten Systems dar. Die beste erreichbare optische Auflösung muss in weiteren Untersuchungen noch ermittelt werden. Für die hier untersuchten Proben ist diese Auflösung vorerst jedoch ausreichend.

Tabelle 2: Bestimmung der Auflösung anhand verschiedener Strukturbreiten aus Abbildung 29

1	2	3	4	5	6	7	8	MW
1,7 µm	1,9 µm	19 µm	1,9 µm	1,9 µm	1,7 µm	1,6 µm	1,6 µm	1,8 µm

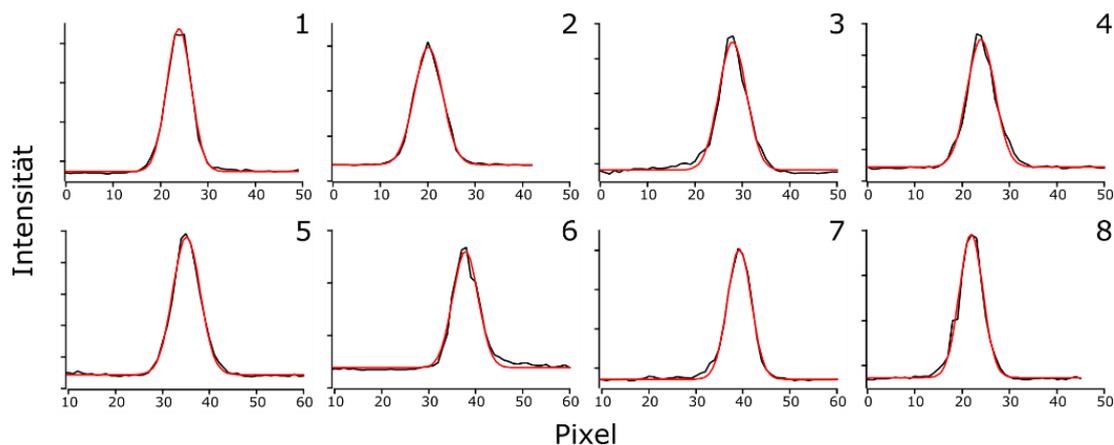


Abbildung 29: Intensitätsprofile mit Gauß-Fit für die in Abbildung 28 markierten Stellen.

Die obigen Aufnahmen wurden mit einer Repetitionsrate von 200 kHz aufgenommen. Der Laser kann aber noch deutlich höhere Repetitionsraten zur Verfügung stellen. Im Folgenden werden einige Aufnahmen mit 1 MHz Repetitionsrate vorgestellt. Die Pulslänge wurde für diese Aufnahmen auf 200 ps eingestellt und die Leistung auf der Probe betrug ca. 50 mW.

Abbildung 30 zeigt vier verschiedene Aufnahmen derselben Probe. Alle Bilder wurden mit Pulsen einer Repetitionsrate von 1 MHz aufgenommen. Die Bilder a) und e) wurden 10-mal gemittelt. Für die ungemittelten Bilder b) und f) ergibt sich jeweils eine Aufnahmedauer von ca. 1,2 s und für die gemittelten ca. 15 s. Die großen Übersichtsbilder links decken einen Bereich von ca. 0,6 mm × 0,6 mm auf der Probe ab. Bei der Skalierung der linken Bilder ist kaum ein Unterschied zwischen den gemittelten und den ungemittelten Bildern erkennbar. Vergrößert man jedoch einen Bereich, so ist deutlich erkennbar, dass die ungemittelten Bilder, wie zu erwarten mehr Rauschen aufweisen, als die ungemittelten.

Auffällig ist jedoch auch, dass in den gemittelten Aufnahmen keine Verschiebung der Probe zu erkennen ist. Das bedeutet, dass man durch die exakte Positionierung der galvanometrischen Spiegel in Kombination mit der Synchronisation aller Komponenten eine besonders hohe Wiederholgenauigkeit des Anregevolumens erreicht. Diese hervorragende Reproduzierbarkeit des Anregeorts ermöglicht verschiedene neuartige Verfahren, um die Probe abzutasten. Eine dieser Möglichkeiten ist z.B. eine Abtastung in größeren Abständen, um eine mögliche thermische Schädigung zu vermeiden. Die Punkte zwischen den großen Abständen werden dann sukzessive in aufeinanderfolgenden Aufnahmen ausgefüllt. Diese sogenannte Schachbrettabtastung wurde in der von mir mitbetreuten Masterarbeit von Daniel Weng näher untersucht [96].

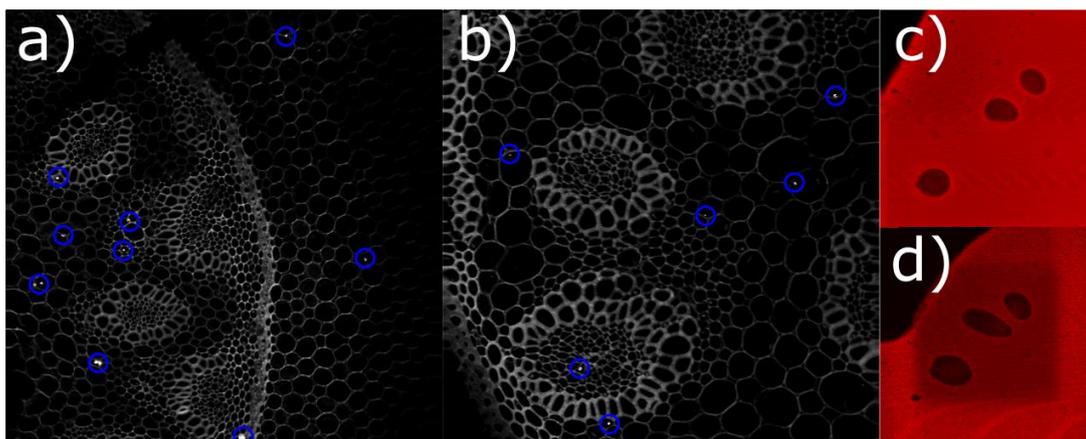


Abbildung 31: Probleme bei der TPEF - Bildgebung. a) und b) Hyperfluoreszenz, c) und d) Ausbleichen der Probe

Das zweite Problem, das man während der Untersuchungen feststellen konnte, war das Ausbleichen der fluoreszierenden Proben. Obwohl die Zweiphotonenanregung ein Ausbleichen der fluoreszierenden Probe vermindert, so tritt dieses Phänomen trotzdem auf. Abbildung 31 c) und d) zeigen eine Rhodamine 6G Probe. Der in c) dargestellte Bereich wurde innerhalb von ca. 3 min mit einer Anregeleistung auf der Probe von ca. 15 mW wiederholt aufgenommen. Abbildung 31 d) zeigt eine größere Aufnahme, bei der die davor aufgenommene Region deutlich dunkler erscheint. Ähnliche Erfahrungen konnten auch mit anderen Proben gemacht werden.

Sowohl die thermische Schädigung von Proben, als auch Ausbleichen von Proben wurde für die Anregung mit Ultrakurzpulslasern intensiv untersucht [95, 110-112]. Inwiefern man diese Ergebnisse auch für Sub-Nanosekunden Pulse zutreffen, muss weiter untersucht werden.

3.3.3 SHG - und TPEF - Bildgebung an Mäusegewebe

Wie in der Einführung angesprochen, ist die Multiphotonenmikroskopie besonders nützlich, wenn man tieferliegende Sichten in stark streuendem Gewebe untersuchen möchte. Um die Anwendbarkeit der hier entwickelten Bildgebungsplattform mit Sub-Nanosekunden Pulsen für diesen Einsatz zeigen zu können, wurden eine Hautprobe einer Maus untersucht.

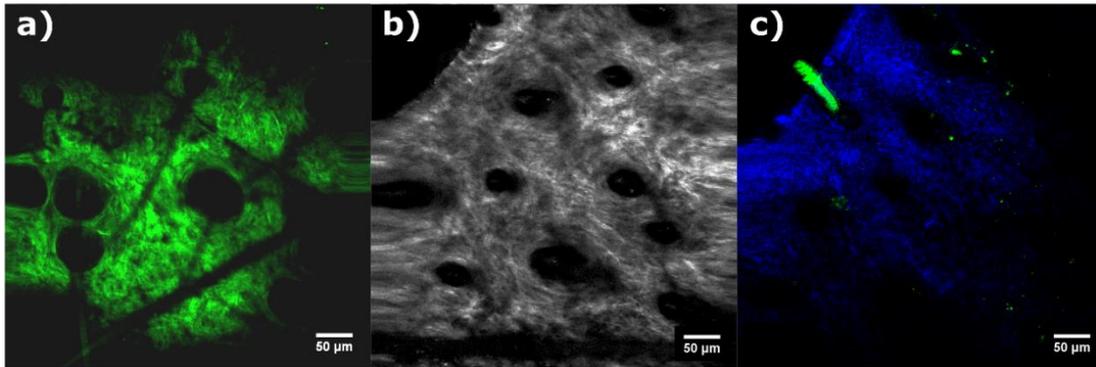


Abbildung 32: a) und b) SHG Signal von Mäusegewebe. c) blau SHG - und grün TPEF - Signal. Skalierungsbalken 50 µm

Die untersuchte Probe einer C57Bl/6J Maus wurde von Jennifer E. Hundt vom Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt. Die Tötung der Mäuse und die Probenentnahme sind über einen Tierversuchsantrag (Kiel: 5_2016-01-19) genehmigt und wurde von zertifiziertem Personal durchgeführt. In Abbildung 32 sind Aufnahmen dieser Hautprobe zu sehen. a) und b) zeigen den SHG Kontrast in der Probe. Die sichtbaren Strukturen sind wahrscheinlich Kollagen, da dieses ein starkes SHG Signal aufweist [113]. Im zweifarbig eingefärbten Bild c) sieht man eine Überlagerung von SHG und TPEF Kontrast. Blau eingefärbt ist das SHG Signal, in diesem Fall etwas schwächer, da es aus einer anderen Tiefe aufgenommen wurde. Grün eingefärbt sieht man den TPEF Kanal, in dem man ein Haarfollikel erkennen kann (vgl. z.B. [114]).

3.4 Multiphotonenmikroskopie mit langen Wellenlängen

Multiphotonenbildgebung ist eine Modalität, die es erlaubt, tief in stark streuende Gewebe einzudringen. Vor allem im Bereich der neuronalen Bildgebung will man dabei in immer tiefere Schichten vordringen [115]. Da Streuung und Absorption die Hauptlimitierungen in biologischem Gewebe für tieferes Eindringen sind, müssen die Bildgebungsparameter so optimiert werden, dass diese Effekte reduziert werden [20]. Eine Möglichkeit tiefer in stark streuendes Gewebe einzudringen ist, Licht mit einer längeren Wellenlänge zu nutzen, da die mittlere freie Weglänge länger ist für Licht mit längerer Wellenlänge [18, 20, 115, 116]. Um die Bildgebung bei längeren Wellenlängen zu ermöglichen, wurden bereits mehrere Farbstoffe für eine Anregung im Bereich von 900 nm – 1600 nm entwickelt [21, 23, 117]. Neben der längeren Wellenlänge, werden auch Pulse mit einer hohen Pulsenergie benötigt, um zusätzlich die Leistungsverluste durch Absorption auszugleichen, die durch eine längere Weglänge höher ausfallen, als bei TPEF-Bildgebung in weniger tiefen Schichten.

Diese Anforderungen stellen eine große Herausforderung für die bisherigen Anregungslaser dar. Die oftmals eingesetzte Kombination aus Ti:Sa und OPO kann zwar in der Regel die passenden Wellenlängen zur Verfügung stellen, allerdings limitieren die ultrakurzen Pulse die Pulsenergie und die Komplexität eines solchen Systems limitiert den Einsatz auf speziell ausgerüstete Optiklabore.

Um diese Limitierungen zu umgehen, wurden bereits unterschiedliche Ansätze untersucht. Wie oben bereits entsprechend dargestellt, haben sich vor allem aktiv modulierte Faserlaser als geeignete Anregungsquellen herausgestellt, da sie günstig, inhärent faserbasiert, und sehr robust sind [12, 24, 28, 83]. Der Hauptnachteil dieser Lichtquellen ist jedoch, dass sie nur bei einer Wellenlänge operieren. In Kapitel 2.4 dieser Arbeit wurde nun vorgestellt, wie man mit einer Kombination aus FWM und SRS die Anregungswellenlänge zu längeren Wellenlängen verschieben kann.

In diesem Unterkapitel wird nun untersucht, inwiefern sich die Pulse bei 1122 nm und 1186 nm für die Anregung roter Fluorophore eignen.

3.4.1 Konfiguration des Multiphotonenmikroskops für TPEF-Bildgebung bei 1122 nm und 1186 nm

Der prinzipielle Aufbau für TPEF-Bildgebung mit den längeren Wellenlängen entspricht dem oben dargestellten. Der Anregungslaser entspricht dem in Kapitel 2 vorgestelltem Aufbau und ist schematisch nochmal in Abbildung 33 dargestellt. Das Prinzip der Wellenlängenverschiebung von den intensiven 1064 nm Pulsen zu

1122 nm und 1186 nm ist ebenfalls weiter oben, in Kapitel 2.4, ausführlich beschrieben worden. Wie in Kapitel 3.3, wurden die Pulsdauer auf 500 ps und die Repetitionsrate auf 200 kHz eingestellt. Im Unterschied zum obigen Aufbau wurde für diese Messungen ein Filterrad (F, vgl. Abbildung 33) nach dem Kollimator eingebaut. Obwohl die optischen Leistungen außerhalb der gewünschten spektralen Bereiche (vgl. Kapitel 2.4) gering sind, wurden diese mit geeigneten Kurz- und Langpassfilterpaaren im Filterrad entfernt. Damit wird sowohl eine unnötige Probenbelastung, als auch eine potentielle Kreuzanregung vermieden. Eine weitere Änderung im optischen Aufbau betrifft das Objektiv. Anstatt des NA 0.8 16x Objektivs (Nikon, CFI75 LWD 16xW) wurde ein NA 1.2 40x Objektiv (Zeiss, C-Apochromat 40x/1.2 W Corr M27) verwendet.

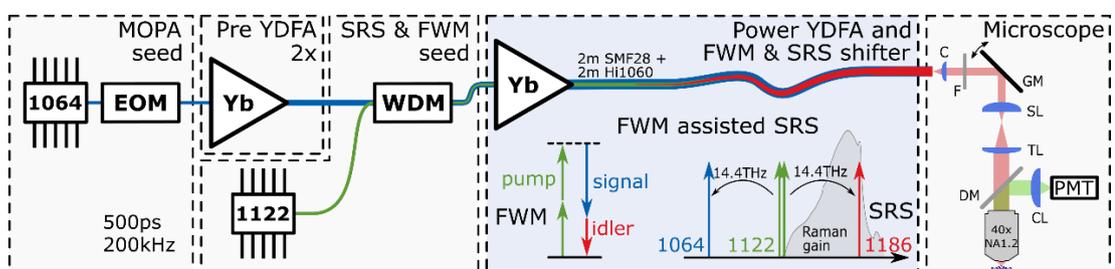


Abbildung 33: Übersicht des Aufbaus für TPEF-Bildgebung mit 1122 nm und 1186 nm.

3.4.2 Bildgebung an gefärbten COS-7 Zellen

Als Referenzprobe für die Bildgebung mit längeren Wellenlängen wurde eine vorgefertigte Mikroskopieprobe mit eingefärbten COS-7 Zellen verwendet. Die COS-7 Zelllinie stammt aus einer Zellkultur, die von Fibroblasten aus der Niere von afrikanischen Meerkatzen gezogen wurde. Die eigentlich für STED-Mikroskopie (engl. Stimulated Emission Depletion) gedachte Probe wurde uns freundlicherweise von Leica Microsystems zur Verfügung gestellt und wurde am Center for Microscopy and Image Analysis der Universität Zürich angefertigt (STED Sample 775). In den Zellen sind zwei Komponenten immunfluoreszenzgefärbt. Einmal Tubulin, ein Teil des Cytoskelets, und einmal die Mitochondrien. Bei der Immunfluoreszenzfärbung wird ein Farbstoff an einen Antikörper gebunden. Der Antikörper dockt dabei nur an spezifische Strukturen in der Zelle an und somit können diese Strukturen mit dem gewählten Farbstoff markiert werden. Für Tubulin wurde dabei der Farbstoff Star-635 (Abberior) an Anti-Tubulin und für die Mitochondrien der Farbstoff Atto-594 (ATTO-TEC) an Anti-Tom20 gebunden. Die Einphotonenabsorptionsspektren und die zugehörigen Emissionsspektren sind in Abbildung 34 dargestellt. Zusätzlich

wurden in den Graphen die möglichen Anregungswellenlängen eingezeichnet. Die durchgezogenen farbigen Linien repräsentieren dabei die entsprechenden halben Wellenlängen.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ergeben sich für die verschiedenen Anregungswellenlängen unterschiedliche Absorptionswahrscheinlichkeiten. Es sei hier jedoch angemerkt, dass die Einphotonenabsorptionsspektren nicht direkt Aufschluss über die Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte liefern. Aufgrund anderer quantenmechanischer Auswahlregeln sind typischerweise mehr Absorptionspeaks vorhanden. Als Faustregel gilt jedoch, dass Fluorophore ein lokales Zweiphotonenabsorptionsmaximum bei der doppelten Wellenlänge der Einphotonenabsorptionsmaxima haben [118]. Oftmals ist die typische blau-verschobene Schulter neben dem Einphotonenabsorptionsmaximum bei der Zweiphotonenanregung genauso ausgeprägt wie das rote Maximum [21]. Mit diesem Gedanken können die Absorptionsspektren hinsichtlich der erwartbaren Absorptionseffizienz analysiert werden.

Bei einer Wellenlänge von 1064 nm, was einer Anregung mit 532 nm entsprechen würde und in Abbildung 34 blau markiert ist, gibt es kaum Überlapp mit den Absorptionsspektren beider Farbstoffe. Eine effiziente Anregung ist mit dieser Wellenlänge somit nicht möglich. Bei einer Anregung mit 1122 nm, grün dargestellt, trifft man die blau verschobene Schulter von Atto-594 und die Absorption bei Star-635 ist noch sehr gering. D.h., bei einer Anregung mit 1122 nm würde man hauptsächlich Signal von den Mitochondrien erwarten. Betrachtet man die Absorptionsspektren für 1186 nm Anregung, so sieht man, dass diese Wellenlänge zum einem zur blau verschobenen Schulter von Star-635 passt und zum anderen fast mit dem Absorptionsmaximum von Atto-594 übereinstimmt. Somit kann bei der Anregung mit 1186 nm Pulsen Signal von beiden Strukturen erwartet werden.

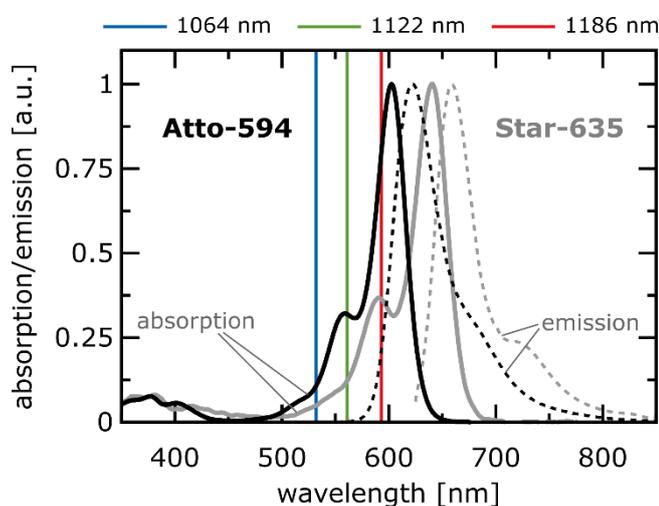


Abbildung 34: Absorptions- und Emissionsspektren von Atto-594 und Star-635.

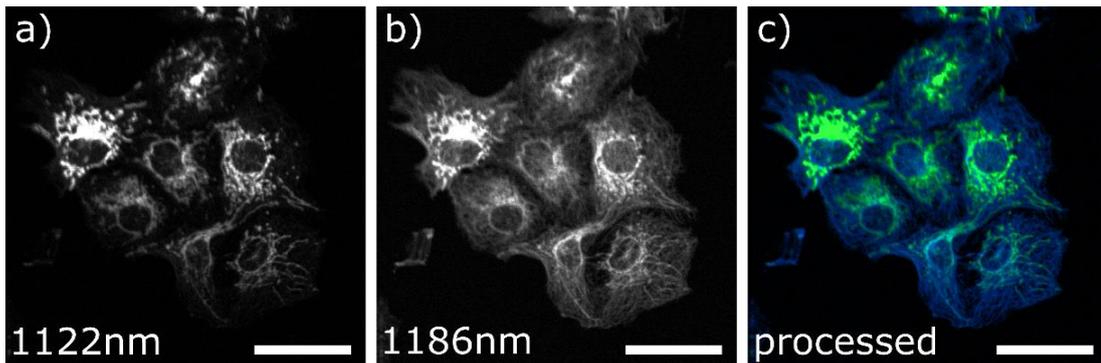


Abbildung 35: Multi-Color TPEF-Aufnahmen von gefärbten COS-7 Zellen. a) und b) zeigen die Rohaufnahmen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Durch einfache Bildverarbeitung kann man die unterschiedlichen Strukturen voneinander trennen.

Mit der so eingefärbten Probe wurden dann jeweils einmal mit 1122 nm Anregung und einmal mit 1186 nm Anregung TPEF Bilder aufgenommen. Die Anregungsleistung wurde auf 30 mW auf der Probe für jede Wellenlänge eingestellt. Die Aufnahmen sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Aufnahmen decken eine Fläche von $180 \mu\text{m} \times 180 \mu\text{m}$ ab und die Pixelverweildauer betrug bei einer Auflösung von 1024×1024 Pixeln $100 \mu\text{s}$ (Skalierungsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$).

Die Abbildung 35 a) zeigt das Signal bei 1122 nm Anregung und b) das Signal bei 1186 nm Anregung. Wie erwartet, sind in a) nur die Mitochondrien sichtbar und in b) sind sowohl die Mitochondrien, als auch Tubuline des Zytoskelets zu sehen.

Normalerweise kann man das Signal der beiden Farbstoffe durch einen dichroitischen Spiegel auf der Detektionsseite trennen und mit zwei Photomultipliern messen. In diesem Fall wurde eine andere Variante benutzt, um die beiden Strukturen unterschiedlich einzufärben, bei der auf den zusätzlichen Detektionskanal verzichtet werden kann. Durch einen einfachen Bildverarbeitungsschritt, bei dem die Intensitäten der Mitochondrienstrukturen in beiden Bildern angeglichen werden und dann das Bild mit 1122 nm Anregung vom Bild mit 1186 nm Anregung abgezogen wird, kann die Tubulin-Struktur separiert werden. Abbildung 35 c) zeigt eine Überlagerung des verarbeiteten Bildes, in blau eingefärbt, mit dem 1122 nm Bild, in grün eingefärbt. Es können klar beide Strukturen, die Mitochondrien in grün und die Tubulin in blau, unterschieden werden. Durch die Multi-Wellenlängenanregung und einem einfachen Bildverarbeitungsschritt, kann somit auf eine spektral selektive Detektion verzichtet werden.

3.5 Fazit Multiphotonenbildung mit Sub-Nanosekunden Pulsen

In diesem Kapitel wurde untersucht, inwiefern die Sub-Nanosekunden Pulse für die Multiphotonenbildung geeignet sind. Der Vergleich mit einem Ultrakurzpulslaser hat gezeigt, dass sowohl mit den kurzen, als auch mit den längeren Pulsen die gleiche Bildqualität erreicht werden kann. Die entscheidende Größe ist dabei nicht die Pulslänge, sondern das Tastverhältnis der Pulse, also das Verhältnis zwischen Pulsdauer und der Zeit zwischen zwei Pulsen. Ist dieses bei beiden Lasern gleich, kann man die gleiche Bildqualität erwarten.

Um die Anwendbarkeit der längeren Pulse auf die Multiphotonenbildung hin weiter untersuchen zu können, wurde ein Multiphotonenmikroskop aufgebaut. Der entscheidende Unterschied zu vergleichbaren Mikroskopen ist, dass hier alle Komponenten synchronisiert sind und dies eine große Flexibilität und neuartige Bildgebungsmethoden ermöglicht. Die hier dargestellten ersten TPEF und SHG Aufnahmen haben die Funktionalität des entwickelten Selbstbau-Multiphotonenmikroskops gezeigt. Das Mikroskop kann nun im routinemäßigen Einsatz benutzt werden und der modulare Aufbau ermöglicht es, verschiedene Komponenten zu tauschen, um verschiedene Fragestellungen zu untersuchen. Vor allem die Untersuchung von möglichen Zellschädigungen oder nachteiligen Effekten von nichtlinearer Bildgebung mit Sub-Nanosekundenpulsen im Vergleich mit ultra-kurzen Pulsen, ist eine dieser Fragestellungen, die in Zukunft untersucht werden.

Des Weiteren hat die TPEF – Bildgebung mit den 1122 nm und 1186 nm Pulsen gezeigt, dass auch die durch FWM unterstütztem SRS erzeugten Wellenlängen für die nichtlineare Bildgebung geeignet sind. Durch die Anregung mit den zwei verschiedenen Wellenlängen und einfacher Bildverarbeitung konnten zwei unterschiedlich eingefärbte Strukturen voneinander getrennt werden, ohne die üblicherweise notwendige spektral selektive Detektion. Somit kann auf einen zweiten Detektor verzichtet werden, was bei einer Miniaturisierung z.B. für ein kleines Handstück von großem Vorteil ist.

4 Single-Pulse Two-Photon Excited Fluorescence Lifetime Imaging: SP-FLIM

Bei ersten Versuchen von Sebastian Karpf im Zusammenhang mit Zweiphotonenbildung mit dem oben beschriebenen Laser und dem schnellen Detektionschema hat sich gezeigt, dass es möglich ist, mit dem vorgestellten System direkt Fluoreszenzlebenszeiten zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Idee weiter verfolgt und ausgearbeitet.

Wie beschrieben, erlaubt die Nichtlinearität der TPEF Bildgebung eine 3D Sektierung der untersuchten Probe und die an bestimmte Zellstrukturen gebundenen Fluorophore eine molekulare Spezifität. Man kann jedoch aus dem Fluoreszenzlicht noch mehr Informationen gewinnen. Neben unterschiedlichen Emissionsspektren von verschiedenen Fluorophoren kann man auch anhand unterschiedlicher Lebenszeiten der Fluorophore Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung einer Probe erhalten. Dabei haben nicht nur verschiedene Farbstoffe unterschiedliche Lebenszeiten, sondern diese Lebenszeiten hängen auch stark von der direkten chemischen Umgebung ab. Man kann somit mit der Messung von Fluoreszenzlebenszeiten, die sich im Bereich von einigen 100 ps bis 10 ns bewegen [90], Aussagen über die molekulare Umgebung eines Farbstoffes treffen und so die Spezifität erhöhen. Dies wird in der Fluoreszenzlebenszeit Bildgebung (engl. fluorescence lifetime imaging, FLIM) als Kontrastmechanismus ausgenutzt [90, 119-121]. Dieser Informationsgewinn ist beispielhaft in Abbildung 36 dargestellt. Das linke Bild zeigt nur die TPEF-Intensität und das rechte Bild zusätzlich die Fluoreszenzlebenszeitinformation. In letzterem können unterschiedliche Strukturen klar getrennt werden.

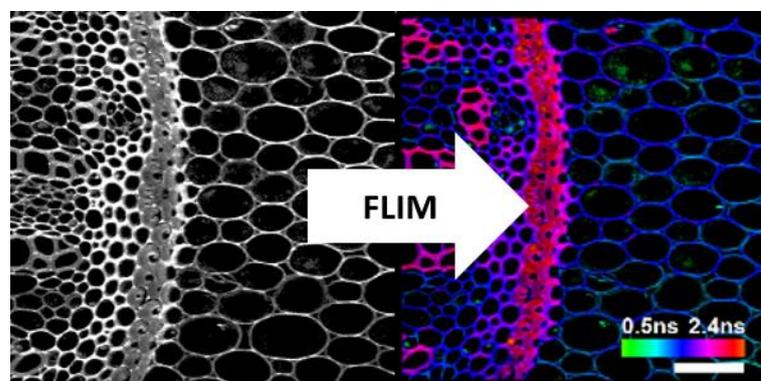


Abbildung 36: Informationsgewinn durch Fluoreszenzlebenszeitanalyse. Der Farbkontrast im FLIM Bild lässt auf die chemische Zusammensetzung schließen.

Der aktuelle Goldstandard für FLIM ist die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl. time-correlated single photon counting, TCSPC) [122-124]. Hier wird die Ankunftszeit des ersten Fluoreszenzphotons nach einem Anregungslaserpuls gemessen. Mit der Aufnahme von vielen solchen Ankunftszeiten kann man ein Histogramm erstellen, das den exponentiellen Fluoreszenzlebenszeitabfall repräsentiert. Diese Methode ermöglicht es mit einer maximalen Photoneneffizienz sehr genau die Zerfallskonstante zu messen. Jedoch hat TCSPC eine wichtige Einschränkung. Aufgrund der elektronischen Konzeption kann es nur ein Photon pro Anregungspuls detektieren. Wenn mehr als ein Photon pro Anregungspuls emittiert wird, so wird die Lebenszeit zu kürzeren Werten verzerrt, weil später ankommende Photonen nicht mehr detektiert werden und somit im Histogramm unterrepräsentiert sind. Um dieses Problem zu umgehen, wird die Anregungsleistung soweit reduziert, bis die Rate, mit der Fluoreszenzphotonen erzeugt werden, auf 1/10 bis auf 1/100 der Pulsanregungsrate gesunken ist. Damit wird die Wahrscheinlichkeit Photonen zu verpassen reduziert.

Wenn man typische Anregungslasersysteme näher betrachtet, kann man mit der genannten Einschränkung abschätzen, welche Aufnahmegeschwindigkeiten mit einem TCSPC Bildgebungssystem möglich sind. In der TPEF Bildgebung werden hauptsächlich Ti:Sa Laser eingesetzt und in der Ein-Photonen-Fluoreszenzbildgebung gepulste Laserdioden. Beide Lichtquellen operieren mit Pulsrepetitionraten von ~ 100 MHz. Wenn ungefähr jeder hundertste Puls ein zu detektierendes Photon erzeugt, ergibt sich eine Zählrate von ~ 1 MHz. Für eine einzelne Lebenszeitbestimmung sind typischerweise 100 oder mehr Photonen nötig. Für ein FLIM Bild ergibt sich somit eine Pixelrate von ~ 10 kHz, was Aufnahmedauern von $\sim 1,5$ min für ein 1024×1024 Pixel großes Bild entspricht. Obwohl TCSPC sehr genaue Messungen ermöglicht, sind durch diese geringe Aufnahmegeschwindigkeit Anwendungen, bei denen eine schnelle Auswertung der Fluoreszenzlebenszeit nötig ist, nicht möglich.

Um diese Beschränkung zu überwinden, gibt es verschiedene Ansätze. Ein prominenter Ansatz ist es, den Fluoreszenzabfall für jeden Anregungspuls direkt in der Zeitdomäne analog zu messen [125-128]. Obwohl es prinzipiell keinen Unterschied macht, ob die Fluorophore mit Zwei-Photonen Absorption oder mit Ein-Photonen Absorption angeregt wurden, beschränkt sich die Betrachtung hier auf die Multiphotonenanregung, da diese in der medizinischen Diagnostik größeres Potential besitzt. So konnte Giacomelli et al. zeigen, dass man mit der Kombination TPEF Bildgebung mit analogem FLIM große Biopsien schnell analysieren kann, um Ärzten bei einer Tumorsektion direkte Rückmeldung über den Erfolg der Behandlung geben zu können [125]. Eine breite Anwendung in Operationssälen konnte dieser Ansatz bis jetzt jedoch noch nicht finden. Wie oben bereits ausführlich geschrieben, stellt die

Zweiphotonenanregung hohe Anforderungen an die Lichtquelle. Somit erschwert die Komplexität der aktuell verfügbaren Lichtquellen die weitere Verbreitung dieser schnellen FLIM Methode.

Ein weiteres großes Problem dieser Methode ist, dass für eine direkte Messung der Fluoreszenzlebensdauer pro Puls viele Fluoreszenzphotonen erzeugt werden müssen, um die relativen Einflüsse von Rauschquellen klein zu halten. So beschreibt Giacomelli und seine Co-Autoren, dass mit deren Ti:Sa Laser basierendem FLIM System zwar unterschiedliche Lebenszeiten in verschiedenen Regionen innerhalb der Probe erkannt werden können, eine genaue Bestimmung selbiger ist jedoch aufgrund von elektronischem Rauschen der Detektoren und Verstärker schwierig. Grund hierfür ist unter anderem, dass mit Ultrakurzpulslasern nur geringe Pulseenergien bereitgestellt werden können und somit nur wenige Fluorophore pro Puls angeregt werden. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist somit in der Regel sehr klein, oftmals besteht es nur aus wenigen Photonen, was eine Messung schwierig macht.

In diesem Kapitel wird nun ein etwas anderer Ansatz beschrieben. Statt eines Ultrakurzpulslasers wird hier der oben vorgestellte aktiv modulierte Faserlaser als Anregelaser benutzt. Mit dieser Lichtquelle können die beiden vorgestellten Probleme beseitigt werden und somit einer weiteren Verbreitung dieser Methode den Weg ebnen. Die technischen Vorteile des vorgestellten Faserlasers gegenüber den typischerweise eingesetzten Ti:Sa-Lasern wurde oben bereits dargestellt. Durch die längeren Pulse ergibt sich jedoch noch ein weiterer Vorteil, der für die diese Methode entscheidend ist. Durch die Verwendung von Pulsen im Bereich von 100 ps statt 100 fs können viel mehr Fluorophore pro Puls angeregt werden und man erhält somit ein viel stärkeres Fluoreszenzsignal. Dies ermöglicht es, bereits mit einem einzigen Anregepuls ausreichend viele Fluoreszenzphotonen zu erhalten, um damit die Lebenszeit zu bestimmen. Daher der Name „Single Pulse FLIM – SP-FLIM“. Die hohen Signale der SP-FLIM Methode machen die Detektion robust gegen die oben erwähnten Rauschquellen. Somit ist es auch möglich, nicht nur Lebenszeitunterschiede zwischen zwei Regionen zu identifizieren, sondern ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio, SNR) erlaubt es für jeden Pixel eine exponentielle Abklingkurve an die Messdaten anzupassen und somit eine Abklingzeitkonstante zu bestimmen. Diese SP-FLIM Methode wird nun in diesem Kapitel ausführlich beschrieben.

Die Ergebnisse der Erforschung der SP-FLIM Methode, sind unter anderem in folgenden Beiträgen veröffentlicht worden:

1. Eibl, M., S. Karpf, D. Weng, H. Hakert, T. Pfeiffer, J.P. Kolb, and R. Huber, *Single pulse two photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate*. *Biomedical Optics Express*, **8**(7) 2017.
2. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Pfeiffer, J.P. Kolb, and R. Huber. *Single pulse two-photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate and an all fiber based setup*. in *Proc. SPIE 10414*, 2017.
3. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, and R. Huber, *Single pulse two-photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate and an all fiber based setup*, in *Topical Problems of Biophotonics. 2017: St. Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia*.
4. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, and R. Huber. *Two-photon-excited fluorescence (TPEF) and fluorescence lifetime imaging (FLIM) with sub-nanosecond pulses and a high analog bandwidth signal detection*. in *Proc. SPIE 10069*, 2017.

4.1 Experimenteller Aufbau der SP-FLIM Bildgebungsplattform

Der prinzipielle Zweiphotonen SP-FLIM Aufbau ist in Abbildung 37 dargestellt. Der schematisch dargestellte Laser entspricht dem in Kapitel 2 vorgestellten Laser und der optische Mikroskopieaufbau dem in Kapitel 3.2 vorgestellten Aufbau. Das Licht mit einer Wellenlänge von 1064 nm wird aus der Faser mit einem Kollimator (C) ausgekoppelt und zwei galvanometrische Spiegel (GM) lenken den Strahl ab, um damit die Probe (sample) abzuscannen. Das erzeugte Fluoreszenzlicht wird mit einem dichroitischen Spiegel (DM) vom Anregungslicht getrennt und auf einen schnellen Photomultiplier (PMT) gelenkt. Das erzeugte Signal wird dann mit einer schnellen analog-zu-digital Konverterkarte (ADC) mit 12 Bit bei 4 GSample/s und 2 GHz analoger Bandbreite digitalisiert. Um ein exaktes Timing zwischen den Komponenten zu gewährleisten, sind der Anregungslaser und die Detektionseinheit mit einem Arbiträrfunctionsgenerator (AWG) synchronisiert.

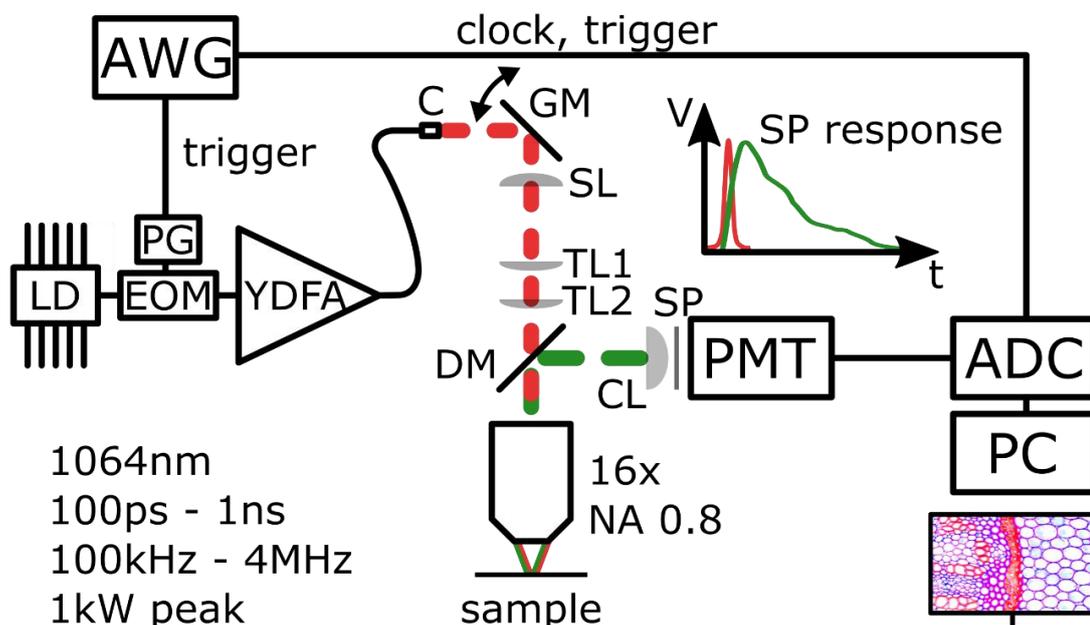


Abbildung 37: Aufbau des SP-FLIM Setups. Ein Funktionsgenerator synchronisiert den Anregungslaser mit der Datenaufnahme. Zusammen mit der hohen Bandbreite der Detektionselektronik können die Lebenszeiten direkt in der Zeitdomäne gemessen werden.

4.2 Datenerfassung für SP-FLIM

Ein zentraler Punkt im Single-Pulse FLIM Ansatz ist die Datenerfassung. Der Aufbau der elektronischen Synchronisation ist bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben worden. Der verwendete PMT (H12056-20, Hamamatsu) hat eine Anstiegszeit von $\tau_{\text{rise}} \sim 600$ ps und die AD-Karte (ATS9373, Alazartech) eine analoge Bandbreite von 2 GHz. Der limitierende Faktor bezüglich analoger Bandbreite ist hier somit durch den PMT gegeben. Es kann erwartet werden, dass Signaländerungen auf einer Zeitskala von ~ 1 ns detektiert werden können. Will man typische Lebenszeiten messen, so ist diese Zeitskala bereits im Bereich der Lebenszeit vieler Fluorophore, welche typische Werte von einigen 100 ps bis 10 ns aufweisen [90]. Die Form des erwarteten Lebenszeitsignals ist jedoch bekannt und folgt einer exponentiell oder multi-exponentiell abfallenden Funktion. Das bedeutet in diesem Fall, dass man mit geeigneten Anpassungsmethoden, die weiter unten angesprochen werden, auch deutlich kürzere Lebenszeiten messen kann, als durch die Zeitskala von ~ 1 ns vorgegeben. Damit diese Anpassungsmethoden funktionieren, muss jedoch sichergestellt sein, dass die Systemantwort (engl. instrument response function, IRF) reproduzierbar gleich bleibt. Als Systemantwort versteht man hierbei das Signal, das man durch Anregen einer Probe erhält, die instantan auf einen Anregepuls reagiert und somit eine Lebenszeit von $\tau = 0$ s hat. Um dies gewährleisten zu können, müssen der Anregepuls und die Datenerfassung ein exaktes Timing zueinander haben. Wenn die IRF genau bestimmt ist, kann man diese mit den unten ausgeführten Anpassungsmethoden herausrechnen. Außerdem ermöglicht ein exaktes Timing, den Zeitpunkt zu berechnen, zu dem das Signal erwartet wird. Damit kann man bei schwachen Signalen eine Mittelung über viele Messungen einfach realisieren. Die Voraussetzungen für die hier angesprochenen Punkte wurden bereits beim Aufbau des Selbstbau-Multiphotonenmikroskops gelegt, somit kann das Mikroskop ohne weitere Änderungen für SP-FLIM-Messungen verwendet werden.

4.3 Datenverarbeitung für Lebenszeitbestimmung

Die erfassten Rohdaten werden mit Hilfe eines LabView-Programms ausgewertet, um die erfassten Bilder mit einem Farbkontrast, entsprechend der bestimmten Lebenszeit, versehen zu können.

Die erfassten Daten werden kontinuierlich in den Arbeitsspeicher des Datenerfassungsrechners geschrieben. Die Karte digitalisiert mit einer Abtastrate von 4 GSample/s und einer Auflösung von 12 Bit. Jeder einzelne Datenpunkt wird jedoch in zwei Byte, also 16 Bit abgespeichert. Das würde einen Datenstrom von mehr als 8 GByte/s bedeuten. Für PCIe 3.0 mit 8 Lanes ist die maximale Übertragungsrate mit ca. 7,9 GByte/s geringer als dieser Wert. Durch geschicktes Packen der Daten, bei dem zwei Datenpunkte in 3 Byte gepackt werden, kann dieser Datenstrom jedoch auf ca. 6 GByte/s reduziert werden. Somit ist es möglich mit Datenpacken und einer Datendurchsatzrate von bis zu 6,8 GByte/s alle erfassten Daten in den Arbeitsspeicher zu übertragen.

Aus diesen zusammenhängenden Datenstrom werden die Bereiche herausgeschnitten, in denen sich relevante Daten befinden. Pro Anregungspuls reichen in der Regel 40 bis 100 Datenpunkte, was einer Zeit von 10 bis 25 ns um den Punkt der Anregung entspricht.

Diese ausgeschnittenen Daten sind die Grundlage für die weiteren Auswertungen. Jedoch kann man anhand dieser Daten die Fluoreszenzlebenszeit nicht direkt ablesen. Das aufgenommene Signal ist nämlich nicht nur von der Probe beeinflusst, sondern auch vom Anregungs- und Detektionssystem und kann durch eine Faltung der Systemantwort mit dem exponentiellen Abfall der Fluoreszenz beschrieben werden.

Um aus den erfassten Daten die Abklingkonstante zu bestimmen, werden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Im ersten Verfahren wird angenommen, dass die Fluoreszenzlebensdauer deutlich länger ist, als die Zeitantwort des Systems. Für die Bestimmung der Abklingkonstante wird dann ein einfacher exponentieller Fit auf die Datenpunkte nach dem Anregepuls angewandt. Obwohl dieses Verfahren keine exakten Lebenszeiten ermittelt, kann man damit Bereiche mit unterschiedlichen Lebenszeiten unterscheiden. Der große Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es wenig rechenintensiv ist und somit eine schnelle Differenzierung verschiedener Bereiche ermöglicht.

Für eine genauere Bestimmung der Abklingkonstante muss die IRF in Betracht gezogen werden. Die IRF gibt die zeitliche Antwort des Systems auf einen instantanen Vorgang wider. Ein solcher instantanter Vorgang ist z.B. das Erzeugen einer Harmonischen in einem Kristall. Die gemessene zeitliche Breite des Signals ist dann

nur durch den Anregepuls und die Detektionselektronik bestimmt. In dieser Arbeit wurde die IRF mit Hilfe von SHG-Signalen von Urea-Kristallen aufgenommen.

Mit der erfassten IRF ist es dann möglich, den exponentiellen Abfall der Intensität des Fluoreszenzlichts zu bestimmen. Der naheliegendste Weg, um aus den Messdaten die Fluoreszenzkurve zu extrahieren, wäre eine Entfaltung. Jedoch ist die Entfaltungsoperation sehr anfällig auf Rauschen. Deshalb wurde eine andere Methode gewählt. Es wurde eine Modellfunktion aufgestellt, die die IRF mit einer analytischen Exponentialfunktion faltet. Diese Modellfunktion wird an die Messdaten in einem Fitverfahren angepasst, indem die Anfangsparameter der Exponentialfunktion verändert werden, bis diese zu den Messdaten passen. Mit dieser sehr robusten Fitmethode ist es möglich, sowohl mono-exponentielle, als auch bi-exponentielle Abklingkurven anzupassen.

Das Ergebnis der Parameterschätzung, d.h. die bestimmte Abklingkonstante und Amplitude, werden für das Einfärben des Zwei-Photonen Bildes genutzt. Dazu werden die erfassten Parameter mit Hilfe des HSV-Farbraums in eine Farbe übersetzt. Die Farbe (engl. hue, HSV) wird durch die Lebenszeit bestimmt. Die Zeit, die sich in der Regel im Bereich von wenigen Nanosekunden befindet, wird mit einer linearen Transformation in einen Wert zwischen 0 und 360 übersetzt, welcher auf einem Farbkreis einer Farbe zugeordnet wird. Der Hellwert, bzw. die Helligkeit (engl. Value, HSV) eines Pixels, wird genutzt um die Intensität des TPEF Signal widerzugeben. Normalerweise werden die Intensitätswerte mit einer linearen Transformation in einen Helligkeitswert übersetzt. Manchmal ist es jedoch sinnvoll eine andere Transformation auszuwählen, um den großen Dynamikumfang des FLIM Bildes besser darzustellen. Eine mögliche Variante ist, die Intensitätswerte mit einer logarithmischen Transformation in Helligkeitswerte zu übersetzen. Dadurch wird der Helligkeitsabstand zwischen Bereichen mit schwachen Signalen zu Bereichen mit starken Signal verringert und somit werden dunkle Bereiche heller dargestellt um besser sichtbar zu werden.

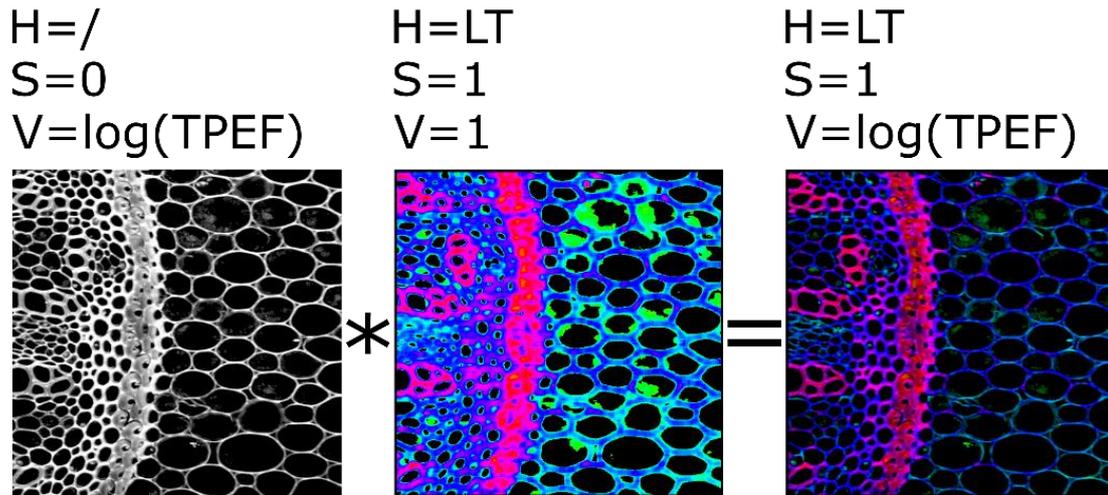


Abbildung 38: Farbgebung für ein FLIM-Bild. Eine Überlagerung aus einem örtlich hochauflösendem TPEF-Intensitätsbild mit einer Lebenszeitkarte ergibt das FLIM-Bild.

In Abbildung 38 ist dieses Verfahren beispielhaft dargestellt. Das Intensitätsbild gibt die Strukturinformation wieder und die Farbgebung ergibt sich aus einem Fluoreszenzlebenszeitfit, bei dem mehrere benachbarte Pixel zusammengefasst wurden, um eine zuverlässigere Lebenszeitbestimmung zu ermöglichen. Die erfassten und verarbeiteten Daten ergeben somit zwei Bilder mit unterschiedlichen Informationen. Multipliziert man beide Bilder im RGB-Farbraum bzw. wendet beide beschriebenen Einfärbemethoden im HSV-Farbraum gleichzeitig an, erhält man ein Bild, das beide Informationen gleichzeitig beinhaltet.

4.4 Charakterisierung des SP-FLIM Aufbaus

Nach diesen Vorüberlegungen und der Beschreibung des experimentellen Aufbaus für die SP-FLIM Messungen wird im Folgenden der Aufbau bezüglich der Qualität der Lebenszeitbestimmung charakterisiert.

4.4.1 Bestimmung der Apparatefunktion (IRF)

Die IRF wurde mit dem SHG Signal von Urea-Kristallen gemessen. Abbildung 39 zeigt auf der linken Seite das TPEF Intensitätsbild (a) der Urea-Kristalle und auf der rechten Seite das FLIM-Bild (b). Die Bilder haben jeweils eine Auflösung von 512×512 Pixel und wurden mit einer Pulsrate von 1 MHz und einem Puls pro Pixel aufgenommen. Daraus ergibt sich eine reine Aufnahmezeit von ~ 260 ms. Da bei der Aufnahme nur uni-direktional gescannt wurde und nur 80 % einer Scanrichtung verwendet wurden, um Artefakte an den Rändern zu vermeiden, betrug die Gesamtaufnahmezeit ~ 670 ms. Für das Bild mit der Farbdarstellung wurde die Intensität logarithmisch dargestellt, um dunkle Bereiche mit wenig Signal besser sichtbar zu machen.

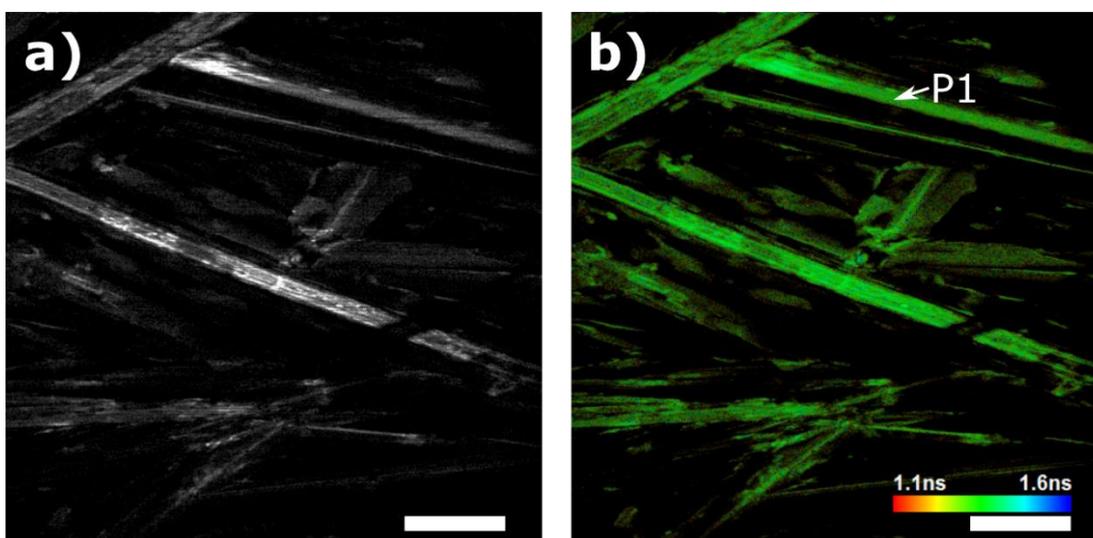


Abbildung 39: SHG-Signal von Urea-Kristallen: a) Intensitätsdarstellung b) Farbgebung anhand der FWHM eines Gaußschen-Fits für jeden Pixel. Skalierungsbalken 100 μm .

Für jedes Pixel in dieser Aufnahme wurden 60 Datenpunkte mit einer Samplerate von 4 GS/s aufgenommen, was einer Zeit von 15 ns entspricht. An die so aufgenommene Transiente wurde eine Gaußkurve angepasst. Diese Kurve gibt die Apparatefunktion oder IRF des gesamten Aufbaus wieder. Das Signal eines repräsentativen Pixels P1 (vgl. Abbildung 39 b)) ist in Abbildung 40 a) dargestellt. Die blaue Kurve

entspricht den aufgenommenen Rohdaten und die rote gestrichelte Line einem gaußschen Fit auf die Daten. An diesem Graphen können interessante Punkte abgelesen werden. Zum einen spiegelt die Amplitude von ~ 30 mV typische Signalhöhen wider. Diese 30 mV entsprechen in etwa 25 Photonen. Obwohl die Amplitudenvarianz des PMTs relativ hoch ist, ermöglicht die hohe Anzahl von detektierten Photonen die Signalamplitude relativ genau zu bestimmen. Zum anderen erkennt man ein niedriges Rauschlevel von ~ 600 μ V. Diese beiden Werte zeigen, dass Aufnahmen mit einem hohen SNR möglich sind. Die FWHM des gaußschen Fits von 1,34 ns entspricht der Zeitauflösung des Systems. Obwohl dies die kürzeste zeitliche Antwort des Gesamtsystems ist, ist es trotzdem möglich kürzere Lebenszeiten zu bestimmen. Wie oben erwähnt, ist das detektierte Signal eine Faltung aus IRF und dem exponentiellen Abfall der Fluoreszenz. Das hohe SNR erlaubt es die IRF aus den aufgenommenen Daten herauszurechnen. Die kürzeste Lebenszeit, die man so herausfiltern kann, ist dann durch die Varianz der FWHM gegeben. Die homogene Farbverteilung in Abbildung 39 b) zeigt bereits, dass die Varianz der IRF klein ist. Die IRF wurde für alle Pixel im Bild analysiert und die Varianz der FWHM wurde zu einem Wert von 63 ps (vgl. Abbildung 40 b)) bestimmt. Damit kann erwartet werden, dass Lebenszeiten im Bereich deutlich kleiner 1 ns bestimmt werden können. Außerdem wurde der zeitliche Jitter der IRF analysiert und zu 136 ps bestimmt. Dieser Jitter ist hauptsächlich durch unterschiedliche Triggerzeitpunkte der Laserdiode hervorgerufen. Durch Verwenden eines schnelleren Funktionsgenerators anstatt des 100 MS/s Funktionsgenerators sollte dieser Wert jedoch deutlich gesenkt werden können. Außerdem erlaubt die hohe Signalqualität auch einen Zentrums-Fit um den Jitter nach der Aufnahme herauszurechnen. Da in den folgenden Messungen Lebenszeiten mit Abklingkonstanten größer 1 ns betrachtet wurden, wurde dieser Jitter hier vernachlässigt.

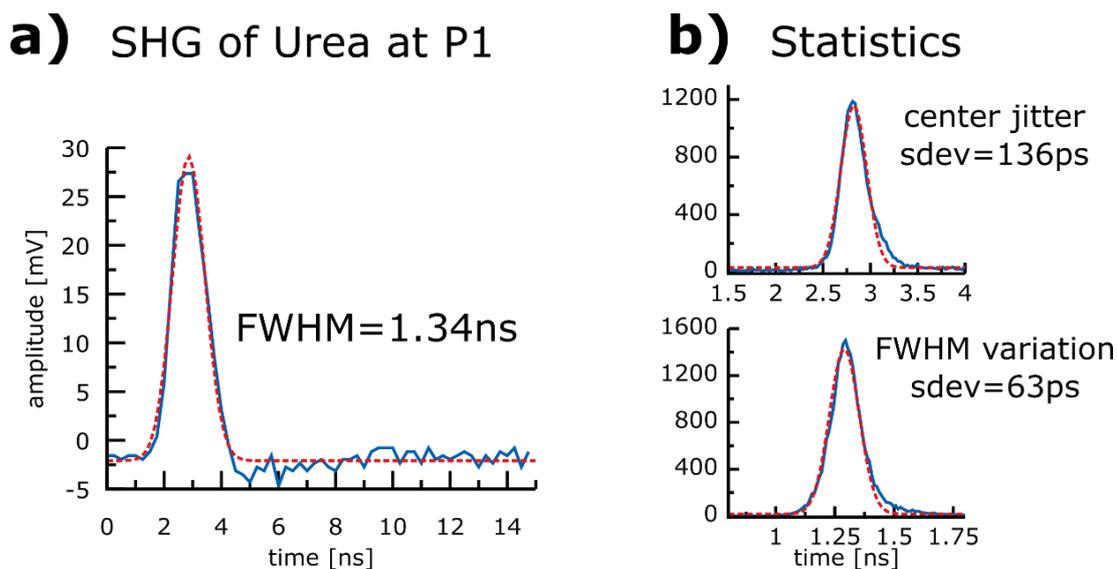


Abbildung 40: Bestimmung der IRF anhand des SHG-Signals von Urea Kristallen: a) SHG-Signal für einen Anregepuls b) Statistische Auswertungen der zeitlichen Antwort für alle Pixel aus Abbildung 39.

4.4.2 Bestimmung der Lebenszeit einer Probe mit einfach-exponentiellem Abfall

Um die Qualität der Lebenszeitbestimmung zu evaluieren, wurde eine Probe mit einem einfach-exponentiellen Abfall und einer bekannten Lebenszeit untersucht. Dazu wurde Rhodamin 6G in Methanol gelöst und auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt. Ein Tropfen dieser Lösung wurde auf einen Objektträger aufgebracht. Dort wurde mit Bruchstücken eines Nr. 1 Deckglases ein ca. 150 μm dünnes Probenvolumen geschaffen und dieses wurde mit einem Nr. 1 Deckglas und Nagellack abgeschlossen um Austrocknung und Verwässerung zu vermeiden. Von dieser Probe wurde eine Region von 0.5 \times 0.5 mm mit einer Auflösung von 1024 \times 1024 Pixel aufgenommen. Die Gesamtaufnahmezeit war 1,9 s und die Rohdatenaufnahme ohne Berücksichtigung der oben erwähnten Scanner-Totzeiten betrug 1,0 s. Abbildung 41 a) die zeigt den aufgenommenen Bereich mit TPEF-Intensitätskontrast.

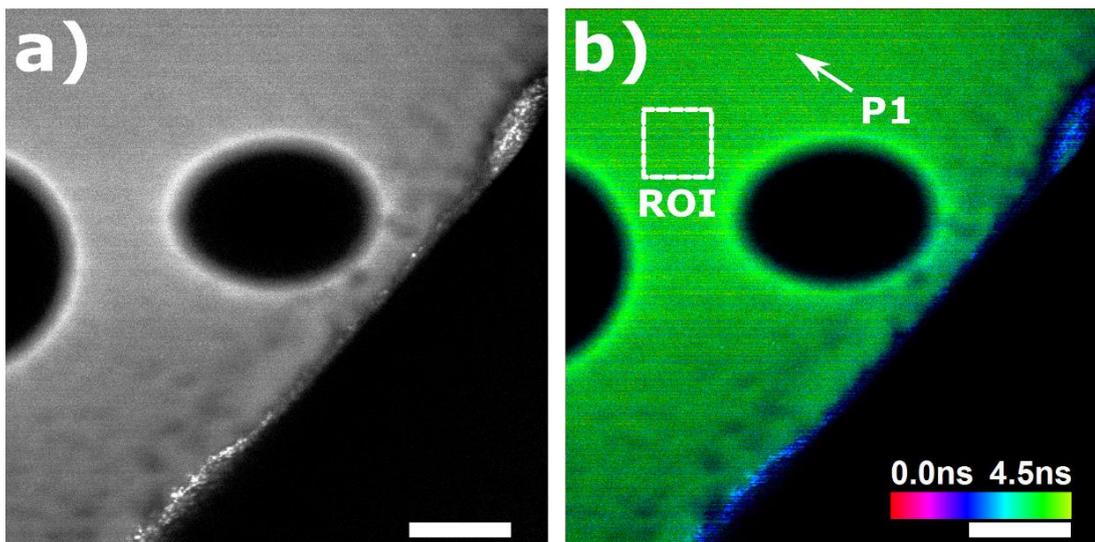


Abbildung 41: Lösung von Rhodamin 6G in Methanol a) TPEF-Intensität b) FLIM-Bild mit 3x3 binning. Skalierungsbalken 100 μm .

Die Löcher sind Luftblasen innerhalb der Probe und die Kante im Bild stammt von einem Stück Deckglas, das als Abstandshalter zwischen Objektträger und Deckglas benutzt wurde. Die Lebenszeitverteilung ist in Abbildung 41 b) farbig dargestellt. Die Lebenszeit wurde mit der oben beschriebenen Methode in eine Farbe übersetzt und die Skalierung reicht von Rot für eine Lebenszeit von 0,0 ns bis Gelb für eine Lebenszeit von 4,5 ns. Die Helligkeit ist durch die TPEF-Intensität gegeben. Für die Lebenszeitbestimmung in diesem Bild wurden 3×3 Pixel gemittelt und die Daten an das Modell angepasst, das die IRF berücksichtigt. Ein Beispielpixel ist im Bild mit P1 markiert. An dieser Stelle wurde die Lebenszeit zu 3,8 ns bestimmt (vgl. Abbildung 42 a)). Außerdem wurde eine Region (ROI) ausgewählt und näher untersucht. Der Mittelwert in diesem Bereich beträgt 3.6 ns mit einer Standardabweichung von 270 ps (vgl. Abbildung 42 b)). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit einem Literaturwert für die molekulare Lebenszeit von Rhodamin 6G von 3,7 ns [129]. Wie die Farbgebung in Abbildung 41 b) zeigt, ist die Verteilung der Lebenszeit um die Luftlöcher sehr homogen. Jedoch sind am Übergang zur Kante des Deckglases stark unterschiedliche Lebenszeiten zu erkennen. Die blauen Bereiche lassen auf eine deutlich kürzere Lebenszeit am Rand schließen was auf eine erhöhte Rhodamin-Konzentration schließen lässt [129]. Vermutlich ist die Lösung an diesen Stellen ausgetrocknet und Rhodamin 6G Moleküle haben sich dort stark aggregiert. Diese Messungen zeigen die Anwendbarkeit der SP-FLIM Methode um Fluoreszenzlebenszeiten exakt zu bestimmen.

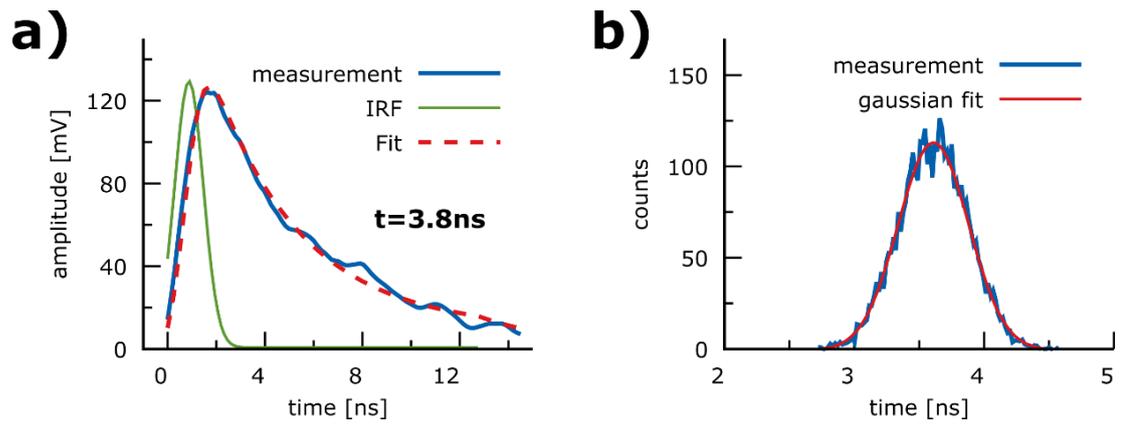


Abbildung 42: Evaluierung der gemessenen Rhodamin-Lebenszeit a) Auswertung von Pixel P1 b) Verteilung der Lebenszeiten innerhalb ROI

4.5 SP-FLIM Bildgebung und Interpretation der Daten

4.5.1 Bildgebung mit bis zu 1 MHz Pixelrate

Um die Leistungsfähigkeit des Zweiphotonen SP-FLIM Systems zu demonstrieren, wurden Bilder mit Lebenszeitkontrast von einem *convalaria majalis* Stamm mit einer Pixelrate von bis zu 1 MHz aufgenommen. Wie oben erwähnt, ist diese Probe mit Acridinorange eingefärbt und eine Standardprobe für Fluoreszenzbildgebung (Lieder GmbH). Die in Abbildung 43 gezeigten Aufnahmen zeigen eine Region von $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ mit einer Auflösung von 512×512 Pixel. Die Anregungsleistung auf der Probe betrug 30 mW. Die Bilder a) und b) wurden mit einer Pixelrate von 1 MHz aufgenommen und Bilder c) und d) 4x gemittelt, was einer Pixelrate von 250 kHz entspricht. Die Gesamtaufnahmedauer der Bilder a) und b) betrug 670 ms wobei die reine Datenaufnahmezeit nur 260 ms betrug. Wie oben erwähnt, wurde nur unidirektional gescannt und da die Scanner starke Nichtlinearitäten an den Rändern zeigten, wurden nur 80% einer Scanrichtung benutzt um Bildartefakte zu vermeiden. In Zukunft wird dieses Problem durch bidirektionales Scannen gelöst und eine Gesamtaufnahmezeiten von ~ 300 ms bei 512×512 Pixel kann erwartet werden.

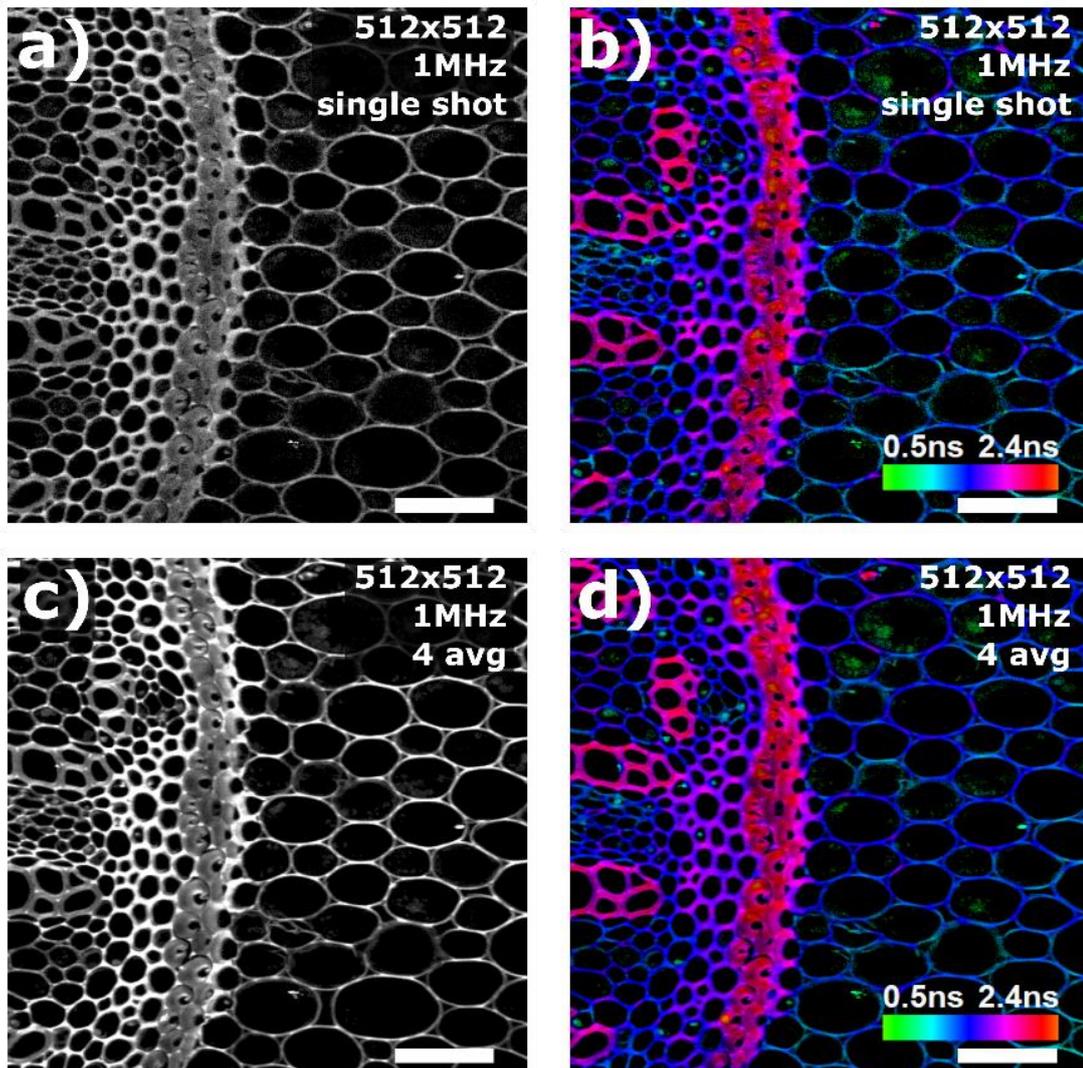


Abbildung 43: TPEF und SP-FLIM Bilder von *convalaria majalis*. a) und b) wurden mit einer Pixelrate von 1 MHz aufgenommen, c) und d) wurden 4x gemittelt. a) und c) zeigen TPEF Kontrast, b) und d) Fluoreszenzlebenszeitkontrast. Skalierungsbalken 100 μm .

Für die FLIM-Bilder in Abbildung 43 und in Abbildung 44 wurden 3×3 Pixel zusammengefasst, um eine zuverlässigere Lebenszeitbestimmung zu erhalten. Um dunklere Bereiche besser sichtbar zu machen, wurde eine logarithmische Übersetzung der TPEF-Intensität in Helligkeit gewählt. Durch diese Transformation erhält man den Eindruck, dass die Auflösung des Bildes schlechter ist, weil dadurch der Intensitätsabfall flacher wurde.

Trotz der hohen Aufnahmegeschwindigkeit zeigen Abbildung 43 a) und b), dass die Qualität der Lebenszeitbestimmung sehr hoch ist. Es können klar die Zellwände der Pflanzen (blaue Farbe) von den Leitbündeln (rote Farbe) und den Chloroplasten innerhalb der Zellen (grüne Farbe) unterschieden werden.

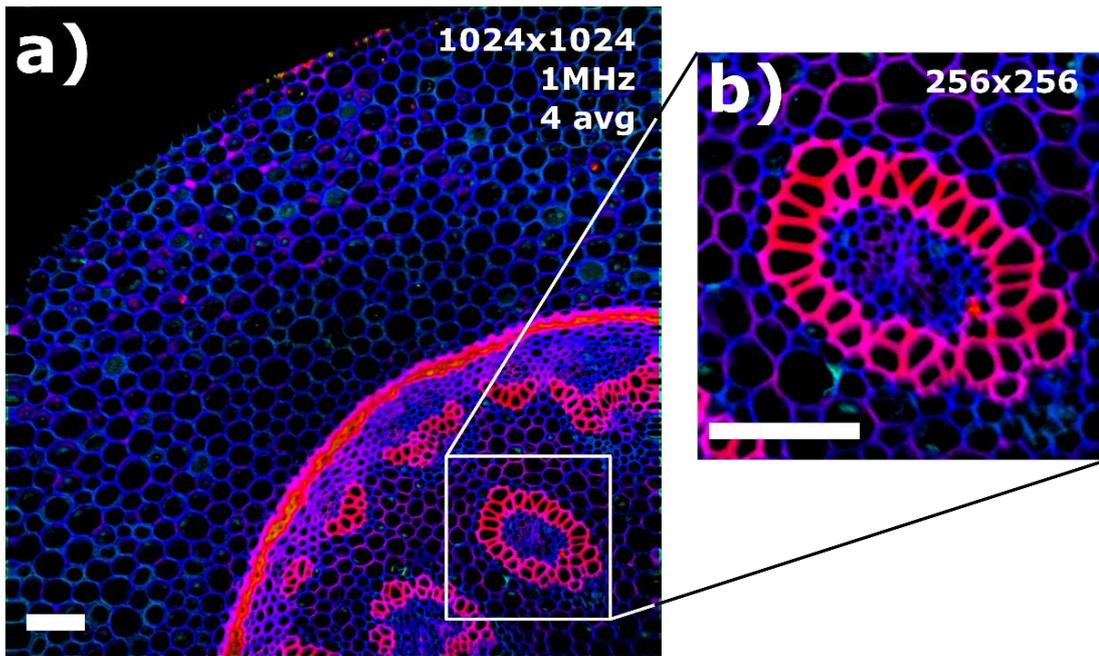


Abbildung 44: Großflächige SP-FLIM Aufnahme von *convalaria majalis*. a) $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$ mit einer Auflösung von 1024×1024 Pixel, aufgenommen in 7.6 s. b) Vergrößerung eines Leitbündels. Skalierungsbalken $100 \text{ }\mu\text{m}$.

Für manche Proben, die eine schwächere Fluoreszenz aufweisen, kann es nötig sein, mehrere Bilder zu mitteln, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Durch die durchgehende Synchronisierung ist Mitteln, auch von einzelnen Bereichen, problemlos möglich. Die 4x gemittelten Abbildung 43 c) und d) und Abbildung 44 zeigen keinerlei Verlust an Auflösung, was auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Scanbereiche schließen lässt. Durch Mitteln konnte die gute Bildqualität von Abbildung 43 b) noch weiter gesteigert werden.

Die hohe Aufnahmegeschwindigkeit erlaubt es außerdem große Bereiche in kurzer Zeit aufzunehmen. Dadurch ist es möglich, eine große Menge an Informationen zu gewinnen, aus denen man nach einer Aufnahme Bereiche weiter analysieren kann, die von besonderem Interesse sind. Abbildung 44 a) zeigt einen Bereich von $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$ mit einer Auflösung von 1024×1024 Pixel derselben *convalaria majalis* Probe. Trotz Mitteln und des dichten Abtasten des Bereichs, betrug die Aufnahmezeit nur 7.6 s. Abbildung 44 b) stellt einen kleinen Bereich aus der großen Aufnahme vergrößert da und zeigt die hohe Detailstufe der Gesamtaufnahme.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hohe Aufnahmegeschwindigkeit des SP-FLIM Konzepts zum einen schnelle Einzelaufnahmen und zum anderen großflächige Aufnahmen möglich macht. Trotz der hohen Geschwindigkeit konnten durch den Fluoreszenzlebenszeitkontrast mehrere Bereiche innerhalb der Probe unterschieden werden.

4.5.2 Vergleich Tail-Fit vs. Fit mit IRF

Die obigen Bilder des Maiglöckchenstängels sind mit Berücksichtigung der IRF ausgewertet worden. Die Berechnung der Lebenszeit für jedes einzelne Pixel dauert dabei relativ lange. Mit einem aktuellen leistungsstarken PC und der gewählten Anpassungsmethode dauert die Auswertung eines 512×512 Pixel großen Bildes bis zu 10 min. Dasselbe Bild mit einer Anpassung an ein einfaches exponentielles Modell hingegen weniger als 1 min. In Abbildung 45 sind die Ergebnisse beider Methoden nebeneinander dargestellt. Für das linke Bild (a) wurde die schnelle Methode gewählt. Es können klar verschiedene Strukturen unterschieden werden. Jedoch ist der farbliche Kontrast zwischen verschiedenen Bereichen nicht sehr ausgeprägt. Vergleicht man damit das rechte Bild (b), bei dem die IRF in der Lebenszeitauswertung berücksichtigt wurde, so ist der Unterschied klar erkennbar. Im rechten Bild sind klar drei verschiedene Strukturen separierbar. Zum einen hebt sich eine rötlich dargestellte Struktur von einer blau eingefärbten Zellstruktur ab, die auch eine etwas andere Morphologie aufweist als die blau eingefärbte und zum anderen erkennt man grüne Bereiche innerhalb der Zellen. Um die Spezifität weiter zu analysieren, wird im nächsten Unterkapitel versucht, die unterschiedlichen Bereiche zu segmentieren.

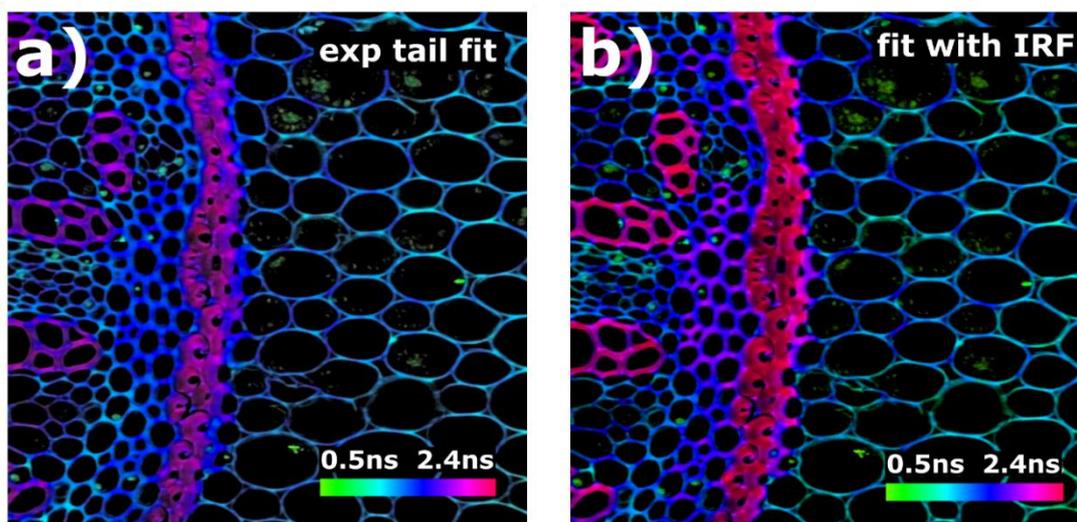


Abbildung 45: Vergleich zwischen einfachen exponentiellem Modell in a) und einem Modell, dass die IRF berücksichtigt in b).

4.5.3 Multi-Komponenten Kontrast anhand unterschiedlicher Lebenszeiten

Wie bereits in Abbildung 43 bis Abbildung 45 zu sehen, können mit FLIM-Bildern unterschiedliche Bereiche in einer Probe identifiziert werden. In diesem Abschnitt soll diese Möglichkeit der Differenzierung genauer analysiert werden. Dazu wurden die Lebenszeiten in Abbildung 43 näher betrachtet und eine Segmentierung der verschiedenen morphologischen Bereiche anhand der Lebenszeiten vorgenommen.

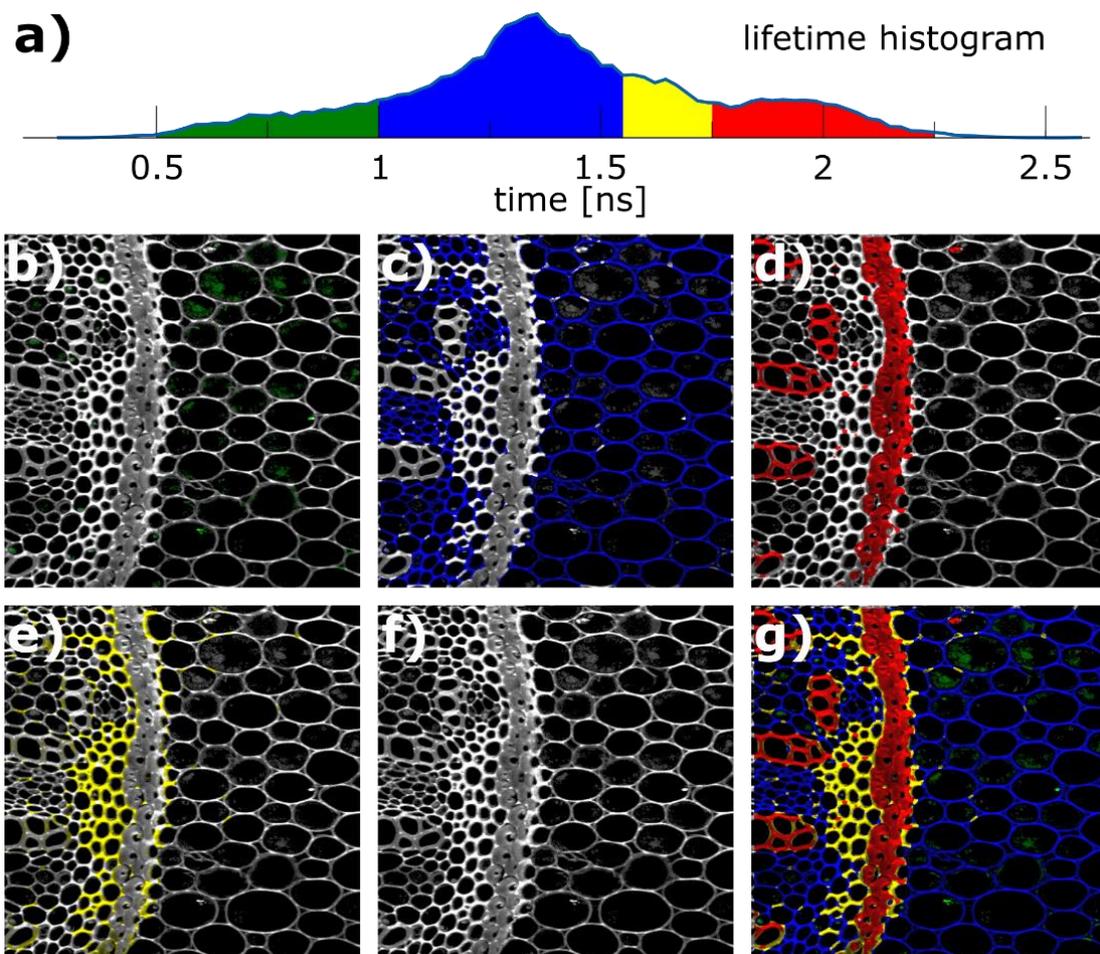


Abbildung 46: Multi-Komponenten Analyse der 4-fach gemittelten SP-FLIM Aufnahme von *convalaria majalis*. a) Histogramm der Lebenszeiten über alle Pixel im Bild, b) TPEF-Aufnahme ohne Lebenszeitinformation, c)-f) einzelne Bereiche entsprechend dem Histogramm eingefärbt, g) Überlagerung aller Komponenten.

Die Frage ist, wie viele unterschiedliche Bereiche in dem Bild unterschieden werden können. Dazu wurden die Lebenszeiten aller Pixel aus dem Bild d) in Abbildung 43 in ein Histogramm aufgetragen. Das Histogramm, in Abbildung 46 a) dargestellt, weist eine Struktur mit mehreren lokalen Maxima auf. Insgesamt konnten vier verschiedene Regionen identifiziert werden. Das ausgeprägteste lokale Maximum kann

einer Lebenszeit von 1,3 ns zugeordnet werden. Neben diesem Maximum kann man eine Schulter bei 0,7 ns und eine bei 1,6 ns erkennen. Für längere Lebenszeiten gibt es noch ein weiteres Maximum bei 1,9 ns. Unter der Annahme, dass diese lokalen Maxima im Lebenszeithistogramm zu unterschiedlichen molekularen Komponenten der Probe gehören, wurden Bereiche ausgewählt und unterschiedlich eingefärbt.

Die vier verschiedenen Bereiche, die für eine Segmentierung der Probe verwendet wurden, sind im Histogramm farblich gekennzeichnet. Pixel mit Lebenszeiten von 0,5 ns – 1,0 ns wurden grün eingefärbt, von 1,0 ns – 1,55 ns blau, von 1,55 ns – 1,75 ns gelb und von 1,75 ns – 2,5 ns rot. Abbildung 46 b) – e) zeigt diese unterschiedlichen Bereiche separat mit den jeweiligen Farben eingefärbt. Als Vergleich ist in Abbildung 46 f) nur das TPEF-Intensitätsbild gezeigt. Anhand der Bilder ist klar ersichtlich, dass die unterschiedlichen Lebenszeiten zu unterschiedlichen morphologischen und funktionalen Regionen innerhalb der Probe gehören. Besonders deutlich können die Leitbündel und ein äußerer Ring um die innere Struktur des Pflanzenstängels (rot) von den äußeren Zellstrukturen (blau) und den Chloroplasten (grün) unterschieden werden. Diese klare Differenzierung ist mit dem Intensitätsbild f) allein nicht möglich. In der Überlagerung, dargestellt in Abbildung 46 g) wird diese Unterscheidung nochmal verdeutlicht.

Anhand dieser Analyse der Lebenszeiten innerhalb eines Bildes und der Identifizierung verschiedener Substrukturen konnte gezeigt werden, dass die Lebenszeitverteilung nicht vom Aufnahmesystem abhängt, sondern von der unterschiedlichen molekularen Zusammensetzung der Probe stammt. Obwohl man mit TCSPC-Systemen eine noch genauere Bestimmung der Lebenszeit erwarten kann, zeigt diese Analyse, dass das schnellere SP-FLIM System in der Lage ist, vier verschiedene Komponenten mit nahe beieinanderliegenden Lebenszeiten mit Unterschieden im Bereich von wenigen 100 ps zu unterscheiden.

4.6 Zusammenfassung SP-FLIM

Mit den präsentierten Resultaten wurde gezeigt, dass längere Pulse im Bereich von vielen 10-Pikosekunden bis zu Nanosekunden nicht nur für TPEF-Bildgebung geeignet sind, sondern zusätzlich eine neue FLIM-Methode ermöglichen. Durch die hohe Energie eines Sub-Nanosekunden Pulses können ausreichend viele Fluorophore in einer Probe angeregt werden, um bereits mit einem einzigen Puls die Lebenszeit bestimmen zu können. Damit wurden hohe FLIM-Aufnahmegeschwindigkeiten mit Pixelraten bis zu 1 MHz möglich. Dies ist um einen Faktor 100 schneller, als der aktuelle Goldstandard TCSPC, mit dem typische Pixelraten von 10 kHz erreicht werden. Im Vergleich zu alternativen schnellen FLIM-Methoden muss im SP-FLIM Ansatz dabei die Qualität der Lebenszeitbestimmung nicht geopfert werden, da die gesamte Abklingkurve digitalisiert wird und es ist möglich die Zerfallskonstante für jeden einzelnen Pixel zu bestimmen.

Mit diesem SP-FLIM Ansatz, der im Wesentlichen aus einer sub-ns gepulsten Lichtquelle und einem Detektionssystem mit einer hohen analogen Bandbreite besteht, konnten Lebenszeiten von unter 1 ns bestimmt werden und 4 verschiedene Bereiche mit nahe beieinanderliegenden Lebenszeiten unterschieden werden. Diese hohe Spezifität ist eine große Bereicherung für die Zweiphotonenmikroskopie, da die oftmals sehr breitbandigen Fluorophore nur wenige Unterscheidungsmöglichkeiten für chemische Strukturen bieten.

Diese vielversprechenden Resultate könnten ein Startpunkt für eine weitere Entwicklung dieser Methode in Richtung klinische oder labortechnische Anwendung markieren. Durch die rasche Entwicklung von neuen Hochgeschwindigkeitsdatenerfassungskarten und schnelleren Detektoren, ist zu erwarten, dass die zeitliche Auflösung in Zukunft noch weiter verbessert werden kann, um die Lücke zu TCSPC Systemen zu schließen. Außerdem bietet der einfache und kostengünstige Aufbau wesentliche Vorteile gegenüber Festkörperlaser basierten Multi-Photonen Bildgebungsplattformen. Zusammen könnte der SP-FLIM Ansatz damit ein vielversprechende Methode sein, um die Vorteile der Zweiphotonen-FLIM Bildgebung in den Alltag von vielen Laboren zu bringen.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Die Multiphotonenmikroskopie ist aktuell technisch noch sehr aufwendig. Deshalb beschränkt sich die Anwendung dieser Methode noch auf optische Labore und kann noch nicht so einfach verwendet werden, wie ein gewöhnliches Lichtmikroskop. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen aber, dass man eine TPEF – und SHG – Bildgebungsplattform kompakt und robust realisieren kann, um diese Methode näher an die Anwender heranzubringen.

Der größte Schritt in diese Richtung ist die kompakte, leistungsstarke und robuste Lichtquelle. Der in dieser Arbeit weiterentwickelte Faserlaser findet in einem 4 HE großen 19“ Rackeinschub Platz und könnte bequem unter einem Labortisch verbaut werden. Der faserbasierte Aufbau und vor allem die Bereitstellung des Anregelichts aus einer SMF machen dabei eine Strahljustage zum Mikroskop über weite Strecken überflüssig, wie dies z.B. bei Ti:Sa Lasern nötig wäre. Anstelle ultrakurzen Pulsen von weniger als 1 ps stellt der Laser Pulse mit einstellbaren Längen von ~ 30 ps bis einigen ns zur Verfügung. Diese typischerweise Sub-Nanosekunden Pulse erreichen Spitzenleistungen von ~ 1 kW und Pulsenergien bis zu $1 \mu\text{J}$. Während diese Parameter ausreichend sind für die Multiphotonenbildung, gibt es eine entscheidende Einschränkung von Faserlasern: die begrenzte spektrale Abdeckung. Typische Faserlaser operieren nur bei einer einzigen Wellenlänge. Hier konnte gezeigt werden, dass man einen Effekt, der zur Leistungslimitierung von Faserlasern führt, die stimulierte Raman Streuung in der Glasfaser, nutzen kann, um diesen Nachteil teilweise zu umgehen. So konnte, durch eine Kombination von FWM und SRS in der Glasfaser selbst, neben einer Wellenlänge von 1064 nm auch Licht bei 1122 nm und 1186 nm erzeugt werden. Durch die instantane Natur der Effekte war es sogar möglich zwischen den Wellenlängen von Puls zu Puls zu schalten.

Diese Lichtquelle wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für die Multiphotonenmikroskopie eingesetzt. Da weitgehend das Paradigma herrscht, dass kürzere Pulse zu einem stärkeren TPEF-Signal führen, wurde zuerst die erreichbare Bildqualität zwischen einen Ultrakurzpulslaser und dem Sub-Nanosekunden Faserlaser näher untersucht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bildqualität dabei nicht von der Pulslänge abhängt, sondern vielmehr vom Produkt aus Pulslänge und Repetitionsrate, dem Tastverhältnis. Somit wurde gezeigt, dass auch mit Sub-Nanosekunden Pulsen die gleiche Bildqualität erreicht werden kann, wie mit aktuell kommerziell erhältlichen Systemen.

Um weitere Effekte von Sub-Nanosekunden Pulsen im Zusammenhang mit Multiphotonenbildung studieren zu können, wurde ein Selbstbau-Multiphotonenmikroskop aufgebaut. Sowohl TPEF – als auch SHG – Aufnahmen von verschiedenen Proben haben die Funktionalität des Mikroskops gezeigt. Dieses Mikroskop bietet nun eine Plattform, um unterschiedliche Fragestellungen zu bearbeiten. So wurden bereits erste Untersuchungen zu möglichen Zellschädigungen und Ausbleichen von Proben vorgenommen und die Anwendbarkeit der wellenlängenverschobenen Pulsen zu 1122 nm und 1186 nm gezeigt.

Die Besonderheit des Selbstbaumikroskops, dass alle Komponenten aktiv synchronisiert werden und eine hohe analoge Detektionsbandbreite vorliegt, hat überdies eine neuartige Methode ermöglicht, wie man Fluoreszenzlebenszeiten messen kann. Die sogenannte SP-FLIM Methode nutzt dabei aus, dass bei den Sub-Nanosekunden Pulsen deutlich mehr Fluoreszenzphotonen erzeugt werden als z.B. bei einer Anregung mit ultrakurzen Pulsen. Die hohe Anzahl an Photonen ermöglicht es, die Lebenszeit der Fluorophore mit einem einzelnen Anregungspuls zu bestimmen. Dadurch wird die Lebenszeitbestimmung deutlich beschleunigt und statt typischen Pixelraten von ~ 10 kHz konnten FLIM Aufnahmen mit Pixelraten bis zu 1 MHz gezeigt werden.

Im Laufe der Forschung an der Sub-Nanosekunden Multiphotonenbildgebungsplattform haben sich bereits einige mögliche Verbesserungen herausgestellt. Die wichtigste Verbesserung betrifft die Lichtquelle. Obwohl bereits drei Anregewellenlängen zur Verfügung gestellt werden können, ist die spektrale Abdeckung immer noch sehr limitiert. Um mehr Fluorophore anregen zu können, muss diese Abdeckung vergrößert werden. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten, von denen zwei besonders vielversprechend sind. Zum einen können die rotverschobenen Wellenlängen frequenzverdoppelt werden. Damit erhält man Anregepulse mit Wellenlängen von 532 nm, 561 nm und 593 nm. Und zum anderen kann FWM in einer PCF genutzt werden, um den Bereich dazwischen abdecken. Dabei muss möglicherweise keine durchgehend abstimmbare Lichtquelle das Ziel sein. Vielmehr könnte eine bestimmte Anzahl an Anregungswellenlängen ausreichend sein, angepasst an eine Auswahl wichtiger Fluorophore.

Sofern mehr Anregungswellenlängen zur Verfügung stehen, ist die Plattform ein vielversprechender Kandidat für ein einfach handzuhabendes und robustes Multiphotonenmikroskop. Damit wäre es möglich, mehr Forschern die vielfältigen Möglichkeiten der Multiphotonenmikroskopie zur Verfügung zu stellen und möglicherweise ist dies der Schritt in Richtung klinischer Anwendung der Multiphotonen – und Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie.

Literaturverzeichnis

1. Göppert-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. Annalen der Physik, **401**(3) 1931.
2. Kaiser, W. and C.G.B. Garrett, *Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺*. Physical Review Letters, **7**(6) 1961.
3. Maiman, T.H., *Stimulated Optical Radiation in Ruby*. Nature, **187** 1960.
4. Denk, W., J. Strickler, and W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, **248**(4951) 1990.
5. Débarre, D., N. Olivier, W. Supatto, and E. Beaurepaire, *Mitigating Phototoxicity during Multiphoton Microscopy of Live Drosophila Embryos in the 1.0–1.2 μm Wavelength Range*. PLOS ONE, **9**(8) 2014.
6. Squirrell, J.M., D.L. Wokosin, J.G. White, and B.D. Bavister, *Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability*. Nature Biotechnology, **17** 1999.
7. Ustione, A. and D.W. Piston, *A simple introduction to multiphoton microscopy*. Journal of Microscopy, **243**(3) 2011.
8. Müller, M., J. Schmidt, S.L. Mironov, and D.W. Richter, *Construction and performance of a custom-built two-photon laser scanning system*. Journal of Physics D: Applied Physics, **36**(14) 2003.
9. Lefort, C., *A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources*. Journal of Physics D: Applied Physics, **50**(42) 2017.
10. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nature Biotechnology, **21**(11) 2003.
11. Hoover, E.E. and J.A. Squier, *Advances in multiphoton microscopy technology*. Nature Photonics **7**(2) 2013.
12. Xu, C. and F.W. Wise, *Recent advances in fibre lasers for nonlinear microscopy*. Nature Photonics, **7**(11) 2013.
13. Squier, J. and M. Müller, *High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging*. Review of Scientific Instruments, **72**(7) 2001.
14. Bestvater, F., E. Spiess, G. Stobrawa, M. Hacker, T. Feurer, T. Porwol, U. Berchner-Pfannschmidt, C. Wotzlaw, and H. Acker, *Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging*. Journal of Microscopy, **208**(2) 2002.
15. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. Journal of the Optical Society of America B, **13**(3) 1996.
16. Birkner, A., C.H. Tischbirek, and A. Konnerth, *Improved deep two-photon calcium imaging in vivo*. Cell Calcium, **64**(Supplement C) 2017.

17. Ritz, J.-P., A. Roggan, C. Isbert, G. Müller, H.J. Buhr, and C.-T. Germer, *Optical properties of native and coagulated porcine liver tissue between 400 and 2400 nm*. *Lasers in Surgery and Medicine*, **29**(3) 2001.
18. Kobat, D., N.G. Horton, and C. Xu, *In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex*. *Journal of Biomedical Optics*, **16**(10) 2011.
19. Horton, N.G., K. Wang, D. Kobat, C.G. Clark, F.W. Wise, C.B. Schaffer, and C. Xu, *In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain*. *Nature Photonics*, **7** 2013.
20. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. *Nature Methods*, **2**(12) 2005.
21. Drobizhev, M., N.S. Makarov, S.E. Tillo, T.E. Hughes, and A. Rebane, *Two-photon absorption properties of fluorescent proteins*. *Nature Methods*, **8**(5) 2011.
22. Velasco, M.G.M., E.S. Allgeyer, P. Yuan, J. Grutzendler, and J. Bewersdorf, *Absolute two-photon excitation spectra of red and far-red fluorescent probes*. *Optics Letters*, **40**(21) 2015.
23. Makarov, N.S., M. Drobizhev, and A. Rebane, *Two-photon absorption standards in the 550-1600nm excitation wavelength range*. *Optics Express*, **16**(6) 2008.
24. Kawakami, R., K. Sawada, A. Sato, T. Hibi, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama, and T. Nemoto, *Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser*. *Scientific Reports*, **3** 2013.
25. Kuramoto, M., N. Kitajima, H. Guo, Y. Furushima, M. Ikeda, and H. Yokoyama, *Two-photon fluorescence bioimaging with an all-semiconductor laser picosecond pulse source*. *Optics Letters*, **32**(18) 2007.
26. Kusama, Y., Y. Tanushi, M. Yokoyama, R. Kawakami, T. Hibi, Y. Kozawa, T. Nemoto, S. Sato, and H. Yokoyama, *7-ps optical pulse generation from a 1064-nm gain-switched laser diode and its application for two-photon microscopy*. *Optics Express*, **22**(5) 2014.
27. Taira, K., T. Hashimoto, and H. Yokoyama, *Two-photon fluorescence imaging with a pulse source based on a 980-nm gain-switched laser diode*. *Optics Express*, **15**(5) 2007.
28. Yokoyama, H., H. Guo, T. Yoda, K. Takashima, K.-i. Sato, H. Taniguchi, and H. Ito, *Two-photon bioimaging with picosecond optical pulses from a semiconductor laser*. *Optics Express*, **14**(8) 2006.
29. Karpf, S., *A system for time-encoded non-linear spectroscopy and microscopy*. Ludwig-Maximilians-Universität München, PhD Thesis 2015.
30. Eibl, M., *Stimulated Raman Spectroscopy with a Rapidly Wavelength Swept Laser*. Technical University Munich and Ludwig-Maximilians-University Munich, Diploma-Thesis 2012.
31. Limpert, J., F. Roser, S. Klingebiel, T. Schreiber, C. Wirth, T. Peschel, R. Eberhardt, and A. Tunnermann, *The Rising Power of Fiber Lasers and*

- Amplifiers*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, **13**(3) 2007.
32. Paschotta, R., J. Nilsson, A.C. Tropper, and D.C. Hanna, *Ytterbium-doped fiber amplifiers*. IEEE Journal of Quantum Electronics, **33**(7) 1997.
 33. Malinowski, A., K.T. Vu, K.K. Chen, J. Nilsson, Y. Jeong, S. Alam, D. Lin, and D.J. Richardson, *High power pulsed fiber MOPA system incorporating electro-optic modulator based adaptive pulse shaping*. Optics Express, **17**(23) 2009.
 34. Lago, L., A. Mussot, M. Douay, and E. Hugonnot, *Single-mode narrow-bandwidth temporally shaped nanosecond-pulse ytterbium-doped fiber MOPA for a large-scale laser facility front-end*. Journal of the Optical Society of America B, **27**(11) 2010.
 35. Chan, H.-Y., S.-u. Alam, L. Xu, J. Bateman, D.J. Richardson, and D.P. Shepherd, *Compact, high-pulse-energy, high-power, picosecond master oscillator power amplifier*. Optics Express, **22**(18) 2014.
 36. Dupriez, P., A. Piper, A. Malinowski, J.K. Sahu, M. Ibsen, B.C. Thomsen, Y. Jeong, L.M.B. Hickey, M.N. Zervas, J. Nilsson, and D.J. Richardson, *High average power, high repetition rate, picosecond pulsed fiber master oscillator power amplifier source seeded by a gain-switched laser diode at 1060 nm*. IEEE Photonics Technology Letters, **18**(9) 2006.
 37. Chemnitz, M., M. Baumgartl, T. Meyer, C. Jauregui, B. Dietzek, J. Popp, J. Limpert, and A. Tünnermann, *Widely tuneable fiber optical parametric amplifier for coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Optics Express, **20**(24) 2012.
 38. Baumgartl, M., T. Gottschall, J. Abreu-Afonso, A. Díez, T. Meyer, B. Dietzek, M. Rothhardt, J. Popp, J. Limpert, and A. Tünnermann, *Alignment-free, all-spliced fiber laser source for CARS microscopy based on four-wave-mixing*. Optics Express, **20**(19) 2012.
 39. Gottschall, T., T. Meyer, M. Baumgartl, B. Dietzek, J. Popp, J. Limpert, and A. Tünnermann, *Fiber-based optical parametric oscillator for high resolution coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy*. Optics Express, **22**(18) 2014.
 40. Gottschall, T., M. Baumgartl, A. Sagnier, J. Rothhardt, C. Jauregui, J. Limpert, and A. Tünnermann, *Fiber-based source for multiplex-CARS microscopy based on degenerate four-wave mixing*. Optics Express, **20**(11) 2012.
 41. Gottschall, T., T. Meyer, M. Schmitt, J. Popp, J. Limpert, and A. Tünnermann, *Four-wave-mixing-based optical parametric oscillator delivering energetic, tunable, chirped femtosecond pulses for non-linear biomedical applications*. Optics Express, **23**(18) 2015.
 42. Ghiringhelli, F., K. Vysniauskas, L.M.B. Hickey, M.N. Zervas, A.N. Malinowski, and D.J. Richardson, *Pulse shaping in high gain all-fibre pulsed MOPA*. CLEO/Europe. 2005 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe, 2005., 2005.
 43. Pask, H.M., R.J. Carman, D.C. Hanna, A.C. Tropper, C.J. Mackechnie, P.R. Barber, and J.M. Dawes, *Ytterbium-doped silica fiber lasers: versatile sources*

- for the 1-1.2 μm region. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, **1**(1) 1995.
44. Brooks, C.D. and F.D. Teodoro, *1-mJ energy, 1-MW peak-power, 10-W average-power, spectrally narrow, diffraction-limited pulses from a photonic-crystal fiber amplifier*. Optics Express, **13**(22) 2005.
 45. He, F., J.H.V. Price, K.T. Vu, A. Malinowski, J.K. Sahu, and D.J. Richardson, *Optimisation of cascaded Yb fiber amplifier chains using numerical-modelling*. Optics Express, **14**(26) 2006.
 46. Jianqiu, X., L. Junhua, L. Lianren, and K. Ueda. *Influence of cross-sectional shape on absorption characteristics of double-clad fiber lasers*. in *Lasers and Electro-Optics, 2002. CLEO '02. Technical Digest. Summaries of Papers Presented at the, 2002*.
 47. Kořka, P., P. Peterka, and V. Doya, *Numerical Modeling of Pump Absorption in Coiled and Twisted Double-Clad Fibers*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, **22**(2) 2016.
 48. Tai, K., A. Hasegawa, and A. Tomita, *Observation of modulational instability in optical fibers*. Physical Review Letters, **56**(2) 1986.
 49. Stolen, R.H. and E.P. Ippen, *Raman gain in glass optical waveguides*. Applied Physics Letters, **22**(6) 1973.
 50. Richardson, D.J., J. Nilsson, and W.A. Clarkson, *High power fiber lasers: current status and future perspectives [Invited]*. Journal of the Optical Society of America B, **27**(11) 2010.
 51. Agrawal, G., *Nonlinear Fiber Optics*. 5 ed. 2013, Amsterdam, Boston: Academic Press
 52. Kobat, D., M.E. Durst, N. Nishimura, A.W. Wong, C.B. Schaffer, and C. Xu, *Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation*. Optics Express, **17**(16) 2009.
 53. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. Current Opinion in Chemical Biology, **7**(5) 2003.
 54. Lim, Y.T., S. Kim, A. Nakayama, N.E. Stott, M.G. Bawendi, and J.V. Frangioni, *Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging*. Mol Imaging, **2**(1) 2003.
 55. Supradeepa, V.R. and J.W. Nicholson, *Power scaling of high-efficiency 1.5- μm cascaded Raman fiber lasers*. Optics Letters, **38**(14) 2013.
 56. Supradeepa, V.R., F. Yan, and W.N. Jeffrey, *Raman fiber lasers*. Journal of Optics, **19**(2) 2017.
 57. Zhang, H., R. Tao, P. Zhou, X. Wang, and X. Xu, *1.5-kW Yb-Raman Combined Nonlinear Fiber Amplifier at 1120 nm*. IEEE Photonics Technology Letters, **27**(6) 2015.
 58. Zhang, H., H. Xiao, P. Zhou, X. Wang, and X. Xu, *High power Yb-Raman combined nonlinear fiber amplifier*. Optics Express, **22**(9) 2014.

59. Zhang, L., C. Liu, H. Jiang, Y. Qi, B. He, J. Zhou, X. Gu, and Y. Feng, *Kilowatt Ytterbium-Raman fiber laser*. Optics Express, **22**(15) 2014.
60. Feng, Y., L.R. Taylor, and D.B. Calia, *150 W highly-efficient Raman fiber laser*. Optics Express, **17**(26) 2009.
61. Runcorn, T., R.T. Murray, E.J. Kelleher, and J.R. Taylor. *Watt-level Nanosecond 589 nm Source by SHG of a Cascaded Raman Amplifier*. in *Lasers Congress 2016 (ASSL, LSC, LAC)*, 2016.
62. Runcorn, T.H., T. Legg, R.T. Murray, E.J.R. Kelleher, S.V. Popov, and J.R. Taylor, *Fiber-integrated frequency-doubling of a picosecond Raman laser to 560 nm*. Optics Express, **23**(12) 2015.
63. Runcorn, T.H., R.T. Murray, E.J.R. Kelleher, S.V. Popov, and J.R. Taylor, *Duration-tunable picosecond source at 560 nm with watt-level average power*. Optics Letters, **40**(13) 2015.
64. Zhang, L., H. Jiang, S. Cui, and Y. Feng, *Integrated ytterbium-Raman fiber amplifier*. Optics Letters, **39**(7) 2014.
65. Bromage, J., *Raman amplification for fiber communications systems*. Journal of Lightwave Technology, **22**(1) 2004.
66. Baumgartl, M., M. Chemnitz, C. Jauregui, T. Meyer, B. Dietzek, J. Popp, J. Limpert, and A. Tünnermann, *All-fiber laser source for CARS microscopy based on fiber optical parametric frequency conversion*. Optics Express, **20**(4) 2012.
67. Lefrancois, S., D. Fu, G.R. Holtom, L. Kong, W.J. Wadsworth, P. Schneider, R. Herda, A. Zach, X. Sunney Xie, and F.W. Wise, *Fiber four-wave mixing source for coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Optics Letters, **37**(10) 2012.
68. Lavoute, L., J.C. Knight, P. Dupriez, and W.J. Wadsworth, *High power red and near-IR generation using four wave mixing in all integrated fibre laser systems*. Optics Express, **18**(15) 2010.
69. Mosley, P.J., S.A. Bateman, L. Lavoute, and W.J. Wadsworth, *Low-noise, high-brightness, tunable source of picosecond pulsed light in the near-infrared and visible*. Optics Express, **19**(25) 2011.
70. Brinkmann, M., S. Janfrüchte, T. Hellwig, S. Dobner, and C. Fallnich, *Electronically and rapidly tunable fiber-integrable optical parametric oscillator for nonlinear microscopy*. Optics Letters, **41**(10) 2016.
71. Lamb, E.S., S. Lefrancois, M. Ji, W.J. Wadsworth, X. Sunney Xie, and F.W. Wise, *Fiber optical parametric oscillator for coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Optics Letters, **38**(20) 2013.
72. Stolen, R. and J. Bjorkholm, *Parametric amplification and frequency conversion in optical fibers*. IEEE Journal of Quantum Electronics, **18**(7) 1982.
73. Fève, J.-P., P.E. Schrader, R.L. Farrow, and D.A.V. Kliner, *Four-wave mixing in nanosecond pulsed fiber amplifiers*. Optics Express, **15**(8) 2007.

74. Sylvestre, T., H. Maillotte, E. Lantz, and P. Tchofo Dinda, *Raman-assisted parametric frequency conversion in a normally dispersive single-mode fiber*. Optics Letters, **24**(22) 1999.
75. Vanholsbeeck, F., S. Coen, P. Emplit, C. Martinelli, F. Leplingard, and T. Sylvestre, *Numerical modeling of a four-wave-mixing-assisted Raman fiber laser*. Optics Letters, **29**(23) 2004.
76. Fève, J.-P., *Phase-matching and mitigation of four-wave mixing in fibers with positive gain*. Optics Express, **15**(2) 2007.
77. Sayinc, H., K. Hausmann, U. Morgner, J. Neumann, and D. Kracht, *Picosecond all-fiber cascaded Raman shifter pumped by an amplified gain switched laser diode*. Optics Express, **19**(27) 2011.
78. Boyd, R.W., *Nonlinear Optics*. 3rd ed. 2008: Academic Press. 640.
79. Ghatak, A. and K. Thyagarajan, *An Introduction to Fiber Optics*. 1998, Cambridge: Cambridge University Press.
80. De Angelis, A., A. Labrüyère, V. Couderc, P. Leproux, A. Tonello, H. Segawa, M. Okuno, H. Kano, D. Arnaud-Cormos, P. Lévêque, and H.-o. Hamaguchi, *Time-frequency resolved analysis of a nanosecond supercontinuum source dedicated to multiplex CARS application*. Optics Express, **20**(28) 2012.
81. Blömker, T., *Neuartige Faserlaserlichtquelle für Stimulierte Raman Mikroskopie*. Universität zu Lübeck, Masterarbeit 2017.
82. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, **59**(3) 1962.
83. Kawakami, R., K. Sawada, Y. Kusama, Y.-C. Fang, S. Kanazawa, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama, and T. Nemoto, *In vivo two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode*. Biomedical Optics Express, **6**(3) 2015.
84. Bewersdorf and Hell, *Picosecond pulsed two-photon imaging with repetition rates of 200 and 400 MHz*. Journal of Microscopy, **191**(1) 1998.
85. Lefort, C., R.P. O'Connor, V. Blanquet, L. Magnol, H. Kano, V. Tombelaine, P. Lévêque, V. Couderc, and P. Leproux, *Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source*. Journal of Biophotonics, 2016.
86. Zhao, Y., H. Nakamura, and R.J. Gordon, *Development of a versatile two-photon endoscope for biological imaging*. Biomedical Optics Express, **1**(4) 2010.
87. So, P.T.C., C.Y. Dong, B.R. Masters, and K.M. Berland, *Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy*. Annual Review of Biomedical Engineering, **2**(1) 2000.
88. Coherent: *Chameleon Compact OPO*, datasheet, accessed: 2017-10-25, <https://cohrcdn.azureedge.net/assets/pdf/Chameleon-OPO-Data-Sheet.pdf>.

89. Rumi, M. and J.W. Perry, *Two-photon absorption: an overview of measurements and principles*. *Advances in Optics and Photonics*, **2**(4) 2010.
90. Berezin, M.Y. and S. Achilefu, *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*. *Chemical Reviews*, **110**(5) 2010.
91. Hillenkamp, F., *Laser Radiation Tissue Interaction*. *Health Physics*, **56**(5) 1989.
92. Donnert, G., C. Eggeling, and S.W. Hell, *Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation*. *Nat Meth*, **4**(1) 2007.
93. Xu, M. and L.V. Wang, *Photoacoustic imaging in biomedicine*. *Review of Scientific Instruments*, **77**(4) 2006.
94. Schönle, A. and S.W. Hell, *Heating by absorption in the focus of an objective lens*. *Optics Letters*, **23**(5) 1998.
95. Masters, B.R., P.T.C. So, C. Buehler, N.P. Barry, J.D.B. Sutin, W.W. Mantulin, and E. Gratton. *Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging*. 2004.
96. Weng, D., *Charakterisierung und Optimierung eines faserbasierten, Sub-Nanosekunden-gepulsten Zwei-Photonen-Anregungsmikroskops hinsichtlich Schadensschwelen und Verträglichkeit zur Bildgebung biologischer Proben*. Universität zu Lübeck, Masterarbeit 2017.
97. Reinholz, F., *Gespräch über Pulsdauer am TriMScope 1*. 2017.
98. Mayrhofer, J.M., F. Haiss, D. Haenni, S. Weber, M. Zuend, M.J.P. Barrett, K.D. Ferrari, P. Maechler, A.S. Saab, J.L. Stobart, M.T. Wyss, H. Johannssen, H. Osswald, L.M. Palmer, V. Revol, C.-D. Schuh, C. Urban, A. Hall, M.E. Larkum, E. Rutz-Innerhofer, H.U. Zeilhofer, U. Ziegler, and B. Weber, *Design and performance of an ultra-flexible two-photon microscope for in vivo research*. *Biomedical Optics Express*, **6**(11) 2015.
99. Rosenegger, D.G., C.H.T. Tran, J. LeDue, N. Zhou, and G.R. Gordon, *A High Performance, Cost-Effective, Open-Source Microscope for Scanning Two-Photon Microscopy that Is Modular and Readily Adaptable*. *PLOS ONE*, **9**(10) 2014.
100. Perillo, E.P., J.E. McCracken, D.C. Fernée, J.R. Goldak, F.A. Medina, D.R. Miller, H.-C. Yeh, and A.K. Dunn, *Deep in vivo two-photon microscopy with a low cost custom built mode-locked 1060 nm fiber laser*. *Biomedical Optics Express*, **7**(2) 2016.
101. Nguyen, Q.T., N. Callamaras, C. Hsieh, and I. Parker, *Construction of a two-photon microscope for video-rate Ca²⁺ imaging*. *Cell Calcium*, **30**(6) 2001.
102. Kolb, J.P., T. Klein, C.L. Kufner, W. Wieser, A.S. Neubauer, and R. Huber, *Ultra-widefield retinal MHz-OCT imaging with up to 100 degrees viewing angle*. *Biomedical Optics Express*, **6**(5) 2015.
103. Horváth, Z.L. and Z. Bor, *Focusing of truncated Gaussian beams*. *Optics Communications*, **222**(1) 2003.
104. Svelto, O., *Ray and Wave Propagation Through Optical Media*, in *Principles of Lasers*. 2010, Springer US: Boston, MA. p. 131-161.

105. Zinth, W. and U. Zinth, *Optik: Lichtstrahlen - Wellen - Photonen*. 2005: Oldenbourg.
106. Young, M.D., J.J. Field, K.E. Sheetz, R.A. Bartels, and J. Squier, *A pragmatic guide to multiphoton microscope design*. *Advances in Optics and Photonics*, **7**(2) 2015.
107. Art, J., *Photon Detectors for Confocal Microscopy*, in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 251-264.
108. Borlinghaus, R.T., H. Birk, and F. Schreiber. *Sensors for True Confocal Scanning*. 2012 [2017-11-01]; Available from: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/sensors-for-true-confocal-scanning/>.
109. fluorophores.org. *normalized absorption and emission spectra of acridine orange*. 2017 [2017-11-15]; Available from: <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/613>.
110. Hopt, A. and E. Neher, *Highly Nonlinear Photodamage in Two-Photon Fluorescence Microscopy*. *Biophysical Journal*, **80**(4) 2001.
111. Patterson, G.H. and D.W. Piston, *Photobleaching in Two-Photon Excitation Microscopy*. *Biophysical Journal*, **78**(4) 2000.
112. Galli, R., O. Uckermann, E.F. Andresen, K.D. Geiger, E. Koch, G. Schackert, G. Steiner, and M. Kirsch, *Intrinsic Indicator of Photodamage during Label-Free Multiphoton Microscopy of Cells and Tissues*. *PLOS ONE*, **9**(10) 2014.
113. Cox, G., E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi, and M.D. Gorrell, *3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation*. *Journal of Structural Biology*, **141**(1) 2003.
114. Campagnola, P.J., A.C. Millard, M. Terasaki, P.E. Hoppe, C.J. Malone, and W.A. Mohler, *Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues*. *Biophysical Journal*, **82**(1) 2002.
115. Tischbirek, C., A. Birkner, H. Jia, B. Sakmann, and A. Konnerth, *Deep two-photon brain imaging with a red-shifted fluorometric Ca²⁺ indicator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(36) 2015.
116. Träutlein, D., F. Adler, K. Moutzouris, A. Jeromin, A. Leitenstorfer, and E. Ferrando-May, *Highly versatile confocal microscopy system based on a tunable femtosecond Er:fiber source*. *Journal of Biophotonics*, **1**(1) 2008.
117. Inoue, M., A. Takeuchi, S.-i. Horigane, M. Ohkura, K. Gengyo-Ando, H. Fujii, S. Kamijo, S. Takemoto-Kimura, M. Kano, J. Nakai, K. Kitamura, and H. Bitó, *Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2*. *Nature Methods*, **12**(1) 2015.
118. Diaspro, A., P. Bianchini, G. Vicidomini, M. Faretta, P. Ramoino, and C. Usai, *Multi-photon excitation microscopy*. *BioMedical Engineering OnLine*, **5**(1) 2006.

119. van Munster, E.B. and T.W.J. Gadella, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)*, in *Microscopy Techniques*, J. Rietdorf, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 143-175.
120. Chang, C.W., D. Sud, and M.A. Mycek, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, in *Methods in Cell Biology*. 2007, Academic Press. p. 495-524.
121. Suhling, K., P.M.W. French, and D. Phillips, *Time-resolved fluorescence microscopy*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **4**(1) 2005.
122. Becker, W., L.M. Hirvonen, J. Milnes, T. Conneely, O. Jagutzki, H. Netz, S. Smietana, and K. Suhling, *A wide-field TCSPC FLIM system based on an MCP PMT with a delay-line anode*. *Review of Scientific Instruments*, **87**(9) 2016.
123. O'Connor, D.V. and D. Phillips, *Time-Correlated Single Photon Counting*. 1984: Academic Press.
124. Becker, W., *Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications*. *Journal of Microscopy*, **247**(2) 2012.
125. Giacomelli, M.G., Y. Sheikine, H. Vardeh, J.L. Connolly, and J.G. Fujimoto, *Rapid imaging of surgical breast excisions using direct temporal sampling two photon fluorescent lifetime imaging*. *Biomedical Optics Express*, **6**(11) 2015.
126. Moon, S., Y. Won, and D.Y. Kim, *Analog mean-delay method for high-speed fluorescence lifetime measurement*. *Optics Express*, **17**(4) 2009.
127. Won, Y., S. Moon, W. Yang, D. Kim, W.-T. Han, and D.Y. Kim, *High-speed confocal fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) with the analog mean delay (AMD) method*. *Optics Express*, **19**(4) 2011.
128. Dow, X.Y., S.Z. Sullivan, R.D. Muir, and G.J. Simpson, *Video-rate two-photon excited fluorescence lifetime imaging system with interleaved digitization*. *Optics Letters*, **40**(14) 2015.
129. Selanger, K.A., J. Falnes, and T. Sikkeland, *Fluorescence lifetime studies of Rhodamine 6G in methanol*. *The Journal of Physical Chemistry*, **81**(20) 1977.

Abkürzungsverzeichnis

ASE	<i>amplified stimulated emission</i>
AWG	<i>arbitrary waveform generator</i>
BC	<i>beam combiner</i>
CW	<i>continous wave</i>
DC	<i>double clad, duty cycle</i>
EOM	<i>elektrooptischen Modulator</i>
FBG	<i>Faser-Bragg-Gitter</i>
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging</i>
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
FWM	<i>four-wave mixing</i>
IRF	<i>instrument response function</i>
LMA fiber	<i>large mode area fiber</i>
MFA	<i>Modenfeldadapter</i>
MFD	<i>Modenfelddurchmesser</i>
MI	<i>modulation instability</i>
MOPA	<i>Master-Oscillator Power Amplifier</i>
NA	<i>numerische Apertur</i>
OSA	<i>optischer Spektrum Analysator</i>
PCF	<i>photonic crystal fiber</i>
PG	<i>Pulsgenerator</i>
PLL	<i>phase-locked-loop</i>
PMT	<i>Photomultipliertube</i>
PS	<i>power supply</i>
SHG	<i>second harmonic generation</i>
SMF	<i>single mode fiber</i>
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i>
SP-FLIM	<i>Single Pulse FLIM</i>
SPM	<i>self phase modulation</i>
SRS	<i>stimulated Raman scattering</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
TCSPC	<i>time-correlated single photon counting</i>
TEC	<i>Thermoelectric Cooler</i>
Ti:Sa-Laser	<i>Titan:Saphir-Laser</i>
TPEF	<i>two-photon excitation fluorescence</i>
WDM	<i>wavelength division multiplexer</i>
YDFA	<i>Ytterbium doped fiber amplifier</i>

Betreute Arbeiten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Masterarbeiten betreut:

[1-3]

1. Weng, D., *Charakterisierung und Optimierung eines faserbasierten, Sub-Nanosekunden-gepulsten Zwei-Photonen-Anregungsmikroskops hinsichtlich Schadensschwellen und Verträglichkeit zur Bildgebung biologischer Proben.* Universität zu Lübeck, Masterarbeit 2017.
2. Hakert, H., *Schnelle Stimulierte-TICO-Raman-Mikroskopie mittels Sparse-Sampling.* Universität zu Lübeck, Masterarbeit 2017.
3. Blömker, T., *Neuartige Faserlaserlichtquelle für Stimulierte Raman Mikroskopie.* Universität zu Lübeck, Masterarbeit 2017.

Publikationsliste

Peer-Reviewed Journalbeiträge [1-8]

1. Eibl, M., D. Weng, H. Hakert, S. Karpf, J.P. Kolb, T. Pfeiffer, J.E. Hundt, and R. Huber, *Wavelength agile multi-photon microscopy with a fiber amplified diode laser*. in preparation.
2. Kolb, J.P., T. Pfeiffer, M. Eibl, H. Hakert, and R. Huber, *High-resolution retinal swept source optical coherence tomography with an ultra-wideband Fourier-domain mode-locked laser at MHz A-scan rates*. Biomedical Optics Express, **9**(1) 2018.
3. Maertz, J., J.P. Kolb, T. Klein, K.J. Mohler, M. Eibl, W. Wieser, R. Huber, S. Priglinger, and A. Wolf, *Combined in-depth, 3D, en face imaging of the optic disc, optic disc pits and optic disc pit maculopathy using swept-source megahertz OCT at 1050 nm*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2017.
4. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, T. Blömker, J.P. Kolb, C. Jirauschek, and R. Huber, *Pulse-to-pulse wavelength switching of a nanosecond fiber laser by four-wave mixing seeded stimulated Raman amplification*. Optics Letters, **42**(21) 2017.
5. Eibl, M., S. Karpf, D. Weng, H. Hakert, T. Pfeiffer, J.P. Kolb, and R. Huber, *Single pulse two photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate*. Biomedical Optics Express, **8**(7) 2017.
6. Karpf, S., M. Eibl, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber, *Shot-Noise Limited Time-Encoded Raman Spectroscopy*. Journal of Spectroscopy, 2017.
7. Karpf, S., M. Eibl, B. Sauer, F. Reinholz, G. Hüttmann, and R. Huber, *Two-photon microscopy using fiber-based nanosecond excitation*. Biomedical Optics Express, **7**(7) 2016.
8. Karpf, S., M. Eibl, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber, *A Time-Encoded Technique for fibre-based hyperspectral broadband stimulated Raman microscopy*. Nature Communications, **6** 2015.

Konferenzbeiträge mit Tagungsband [1-14]

1. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Pfeiffer, J.P. Kolb, and R. Huber. *Single pulse two-photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate and an all fiber based setup*. in Proc. SPIE 10414, 2017.
2. Hakert, H., M. Eibl, S. Karpf, and R. Huber. *Sparse-sampling with time-encoded (TICO) stimulated Raman scattering for fast image acquisition*. in Proc. SPIE 10414, 2017.
3. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Blömker, and R. Huber. *Pulse-to-Pulse Wavelength Switchable Fiber Laser for Multi-Color Two-Photon Excitation Fluorescence (TPEF) Microscopy*. in CLEO-Europe, 2017.

4. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, T. Blömker, and R. Huber. *Pulse-to-pulse wavelength switching of diode based fiber laser for multi-color multi-photon imaging*. in *Proc. SPIE 10083*, 2017.
5. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, and R. Huber. *Two-photon-excited fluorescence (TPEF) and fluorescence lifetime imaging (FLIM) with sub-nanosecond pulses and a high analog bandwidth signal detection*. in *Proc. SPIE 10069*, 2017.
6. Kolb, J.P., T. Klein, M. Eibl, T. Pfeiffer, W. Wieser, and R. Huber. *Megahertz FDML laser with up to 143nm sweep range for ultrahigh resolution OCT at 1050nm*. in *Proc. SPIE 9697*, 2016.
7. Pfeiffer, T., W. Wieser, T. Klein, M. Petermann, J.-P. Kolb, M. Eibl, and R. Huber. *Flexible A-scan rate MHz OCT: computational downscaling by coherent averaging*. in *Proc. SPIE 9697*, 2016.
8. Eibl, M., S. Karpf, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber. *Hyperspectral stimulated Raman microscopy with two fiber laser sources*. in *Proc. SPIE 9536*, 2015.
9. Karpf, S., M. Eibl, and R. Huber. *Nanosecond two-photon excitation fluorescence imaging with a multi color fiber MOPA laser*. in *Proc. SPIE 9536*, 2015.
10. Karpf, S., M. Eibl, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber. *Time-encoded Raman scattering (TICO-Raman) with Fourier domain mode locked (FDML) lasers*. in *Proc. SPIE 9541*, 2015.
11. Karpf, S., M. Eibl, T. Klein, W. Wieser, and R. Huber. *Hyperspectral Stimulated Raman Microscopy with Fiber-based, Rapidly Wavelength Swept cw-Lasers*. in *CLEO: 2014*, 2014.
12. Eibl, M., S. Karpf, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber. *Broadband, High Resolution Stimulated Raman Spectroscopy with Rapidly Wavelength Swept cw-Lasers*. in *CLEO: 2014*, 2014.
13. Karpf, S., M. Eibl, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber. *FDML Raman: High Speed, High Resolution Stimulated Raman Spectroscopy with Rapidly Wavelength Swept Lasers*. in *CLEO: 2013*, 2013.
14. Karpf, S., M. Eibl, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber. *FDML Raman: New High Resolution SRS with ultra broadband spectral coverage*. in *2013 Conference on Lasers and Electro-Optics - International Quantum Electronics Conference*, 2013.

Konferenzbeiträge ohne Tagungsband (nur Erstautorenbeiträge) [1-3]

1. Eibl, M., S. Karpf, H. Hakert, D. Weng, and R. Huber, *Single pulse two-photon fluorescence lifetime imaging (SP-FLIM) with MHz pixel rate and an all fiber based setup*, in *Topical Problems of Biophotonics*. 2017: St. Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia.
2. Eibl, M., S. Karpf, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber, *Laser sources for Time-Encoded Raman microscopy: FDML probe and multi-wavelength MOPA pump*

lasers for fiber-based, hyperspectral SRS microscopy, in *MicroCor 2014*. 2014: Heidelberg, Germany.

3. Eibl, M., S. Karpf, W. Wieser, T. Klein, and R. Huber, *Swept Source Raman Spectroscopy*, in *ICORS 2014*. 2014: Jena, Germany.

Patentanmeldungen [1-3]

1. Huber, R.A., T. Klein, W. Wieser, S. Karpf, and M. Eibl, *System and method for stimulated raman spectroscopy*, int. PCT application no: PCT/EP2014/059566, publication date: 16.03.2016.
2. Huber, R.A., S. Karpf, and M. Eibl, *A System and Method for Inducing and Detecting Multi-Photon Processes in a Sample*, int. PCT application no: PCT/EP2015/062371, publication date: 10.12.2015.
3. Huber, R.A., S. Karpf, and M. Eibl, *Coherent dynamically controllable narrow band light source*, int. PCT application no: PCT/EP2014/059552, publication date: 13.11.2014.

Lebenslauf

Matthias Eibl

geboren am 9.9.1985

in Passau



Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| 02/2013 – 02/2018 | Bearbeitung der vorliegenden Doktorarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Robert A. Huber
Universität zu Lübeck |
| 10/2007 – 10/2012 | Studium der Physik (Diplom)
Technische Universität München |
| 10/2006 – 06/2007 | Grundwehrdienst, Hochgebirgsjägerzug
Bad Reichenhall |
| 09/2004 – 07/2006 | Fachgebundene Hochschulreife
Berufsoberschule Deggendorf und Passau |
| 08/2001 – 01/2004 | Berufsausbildung zum Informatikkaufmann
Sparkasse Passau |
| 09/1991 – 07/2001 | Mittlere Reife
Grundschule Enzersdorf und Realschule Tittling |

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die tatkräftige Unterstützung von vielen Personen nicht möglich gewesen. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken.

Zuvorderst geht dabei mein Dank an Robert Huber, der es mir ermöglicht hat, in seiner Gruppe diese Arbeit anzufertigen. Seine Begeisterung für die Forschung und technische Dinge im Allgemeinen hat dabei immer wieder geholfen, um mich neu zu motivieren. Er war immer für mich erreichbar und hatte stets einen Tipp parat, wenn ich nicht weiter wusste. Gleichzeitig hat er mir viel Freiheit gegeben, um meine eigenen Ideen auszuarbeiten, was es mir ermöglicht hat, mich sowohl fachlich, als auch persönlich weiterzuentwickeln. Besonders möchte ich die freundschaftliche und offene Art von ihm hervorheben, die zu einer besonders guten Atmosphäre in unserer Gruppe beigetragen hat.

Neben Robert habe ich vor allem drei Doktorandenkollegen viel zu verdanken. Sebastian „Nino“ Karpf hat vor mir mit dem Projekt „Nichtlineare Bildgebung“ begonnen und die wichtigsten Entwicklungen in dieses Projekt eingebracht. Ohne seine guten Ideen wäre diese Arbeit sicherlich nicht so erfolgreich verlaufen. Außerdem hätte ich mich ohne seine begeisternde Art und die hervorragende Zusammenarbeit während meiner Diplomarbeit möglicherweise nicht auf diesen Weg begeben. Auf diesem Weg waren vor allem Tom Pfeiffer und Jan Philip Kolb die meiste Zeit meine Mitstreiter. Sie standen immer mit Rat und Tat zur Seite und diskutierten gerne mit mir über physikalische Fragestellungen, von denen keiner von uns große Ahnung hatte. Weit mehr, als die fachliche Unterstützung durch die drei, wiegt dabei jedoch die Freundschaft, die in dieser Zeit entstanden ist und über so manche schwierige Phase hinweggeholfen hat.

Zu diesen langjährigen Weggefährten sind mit Daniel, Hubertus und Torben in Lübeck noch drei Masterstudenten gekommen, die nun als Jungdoktoranden das Projekt „Nicht-lineare Bildgebung“ weiterführen. Denen danke ich sowohl für das eingebrachte Interesse, als auch für die fruchtbare und angenehme Zusammenarbeit.

Die Unterstützung, die ich während meiner Zeit in der Huber Gruppe erfahren habe, beschränkt sich jedoch nicht auf die oben genannten Personen. Die gesamte Gruppe hat mir immer wieder bei verschiedenen Problemen weitergeholfen und für die insgesamt gute Stimmung in unseren Büros und Laboren gesorgt. Ohne jeden einzeln aufzuführen, möchte ich allen dafür danken.

Ebenso danke ich allen Kollegen am BMO, sowohl in Lübeck, als auch in München, für die interessanten und anregenden Gespräche und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Neben meinen Kollegen habe ich vor allem Natalie viel zu verdanken. Sie ist mir von Anfang des Studiums bis zum Schluss dieser Arbeit an meiner Seite gestanden.

Zu guter Letzt danke ich meiner ganzen Familie, die mich während meines Studiums sowohl finanziell, als auch moralisch unterstützt hat. Bei Ihnen habe ich immer einen Ruhepol gefunden und wurde auch mit leichten norddeutschen Sprachfehlern immer wieder gerne in der bayrischen Heimat aufgenommen.