

Kapitel 1

Superaufgelöste

Femtosekundenlaser-Nanochirurgie von Zellen

In diesem Kapitel werden Femtosekundenlaser-Nanochirurgie-Experimente an fluoreszenzmarkierten Strukturen in Zellen mit einem räumlich superaufgelösten Laserstrahl vorgestellt. Die Strahlgröße im Fokus lässt sich durch die Superauflösung verringern und damit die Präzision von Schnitten in der Nanochirurgie erhöhen [Pos11].

1.1 Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die Grundlagen der Bildgebung und Bearbeitung von biologischem Gewebe mit Femtosekunden-Laserpulsen und die theoretischen Ergebnisse der Strahlformung von räumlich superaufgelösten Laserstrahlen vorgestellt.

Eine sehr kleine laterale Ausdehnung des veränderten Volumens ist notwendig, um Kollateralschäden in der Nähe des Laserfokus zu minimieren und die langfristige Viabilität der Zellen zu sichern. In dem Regime geringer Elektronendichten wird kaum thermische oder mechanische Energie in das umgebende Medium übertragen [Vog05; Kue10]. Durch die Nutzung von Mikroskopobjektiven mit hoher NA und Laserpulsenergie in der Nähe der Ablationsschwelle ist daher die laterale Ausdehnung des veränderten Materials auf weniger als einen Mikrometer eingegrenzt. [KRF01; Vog05; Kue10]. Diese beugungsbegrenzte Auflösung kann durch eine Technik verbessert werden, die allgemein als Superauflösung (*Superresolution*) bezeichnet wird [SM97].

1.1.1 Superauflösung

Im Rahmen der Bildgebung bezieht sich der Begriff Superauflösung auf jede Technik, welche die Auflösung eines bildgebenden Systems über den beugungsbegrenzten Wert hinaus verbessert [Hec01]. Superauflösung wird erreicht durch Veränderung der transversalen Phasen- oder Amplitudenverteilung des Laserstrahls. Sie wurde in vielen Anwendungen wie der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie [Boy02; Jua03; GHR05] oder der optischen Datenspeicherung [Cox84; SK96; WH99] erfolgreich eingesetzt. Für die Strahlformung wird ein Phasen- oder Amplitudenfilter vor die Austrittsblende des optischen Systems (hier des Mikroskopobjektivs) platziert, wie in Abbildung 1.1 dargestellt.

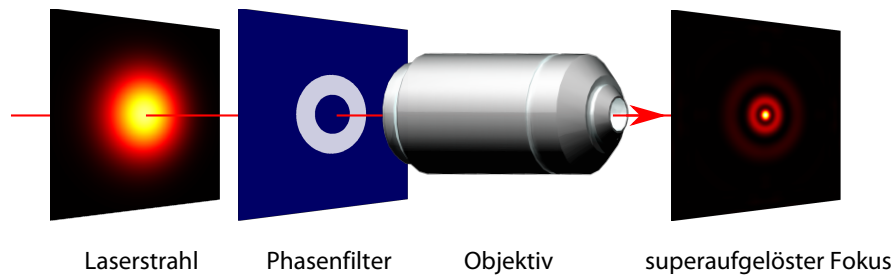


Abbildung 1.1: Strahlausbreitung durch Phasenfilter und Mikroskop Objektiv.

In den ersten Ansätzen wurden diese Filter umgesetzt durch die Blockierung des Lichts in konzentrischen ringförmigen Zonen [Cox84]. In späteren Arbeiten wurde primär das Design von reinen Phasenfiltern aufgrund der besseren Transmission untersucht [And92; WG01; Jua04; LYJ06; Liu08]. Diese Phasenfilter beruhen auf zwei oder mehr ringförmigen Zonen mit wechselweiser Phasendifferenz von π . Die Reduktion der Strahlgröße ist typischerweise begleitet von einer Ausdehnung der Fokallänge (*depth of focus*, *DOF*) [Liu08; WG01]. Reine Phasenfilter haben den Vorteil, dass sie sich in optischen Phasenformern, wie verformbaren Spiegeln (*deformable mirrors*) oder räumlichen Strahlformern, dynamisch umsetzen lassen. Darüber hinaus lassen sie sich als statische Phasenmasken in Glas fertigen [WH99; LYJ06]. Der Aufbau, der in dieser Arbeit verwendeten Phasenfilter und die daraus resultierende Ergebnisse für die Superauflösung werden als nächstes vorgestellt.

1.1.2 Superauflösung mit Ringphasenfiltern

Die in dieser Arbeit verwendeten Phasenfilter bestehen aus drei ringförmigen Zonen mit einer Phasendifferenz von π zwischen benachbarten Zonen, wie dargestellt in Abbildung 1.2. Dieser Filter ist definiert durch die Radien r_a und r_b mit $0 \leq r_a \leq r_b \leq 1$ sowie der Phasenringbreite $\Delta r = r_b - r_a$, jeweils normiert auf die maximale Apertur (siehe Abbildung 1.2). Die Leistungsfähigkeit von Superauflösungsfiltern wird anhand der Punktspreizfunktion (*point spread function*, *PSF*) beschrieben. Diese Funktion gibt an, wie eine Lichtquelle in einem Mikroskopsystem auf die Fokusebene abgebildet wird. Im Rahmen der skalaren Beugungstheorie entspricht sie daher der fouriertransformierten der Lichtquelle an der Austrittsblende des Mikroskopobjektivs (siehe Abschnitt ??). Abbildung 1.3 zeigt den Querschnitt durch die PSF für einen unveränderten und einen superaufgelösten Strahl. Aus dieser Darstellung lassen sich drei Faktoren zur Quantifizierung der Superauflösung ableiten: die Strahlgröße G , Spitzenintensitätsabfall S (Strehl-Faktor) und die Höhe des ersten Nebenmaximums M . Der Strehl-Faktor S ist definiert als das Verhältnis der Spitzenintensität der superaufgelösten PSF zur Spitzenintensität des ungeformten Strahls. Der Faktor M gibt die Höhe des ersten Nebenmaximums normiert auf die Spitzenintensität (S) an. Die Strahlgröße G wird hierbei definiert durch den Radius, bei dem die zentrale Spitzenintensität einer superaufgelösten PSF auf null abgefallen ist, normiert auf den entsprechenden Radius eines ungeformten Intensitätsprofils [SM97]. Bei dem unveränderten Gaußstrahl entspricht der Nullpunkt dem Minimum zum nächsten Beugungsring, welcher aufgrund der Beugung an der kreisförmigen Apertur des Mikroskopobjektivs entsteht. Bei den superaufgelösten Strahlen entstehen die Nebenmaxima aufgrund der zusätzlichen Beugung an der Phasenmaske. Für eine Verbesserung der Superauflösung sind niedriger G -, hohe S - und geringe M -Werte von Vorteil.

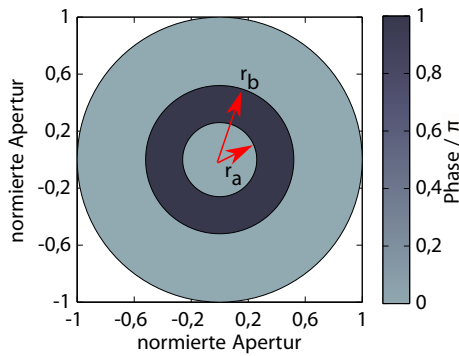


Abbildung 1.2: Aufbau der Phasenmaske und Definition der Radien r_a und r_b .

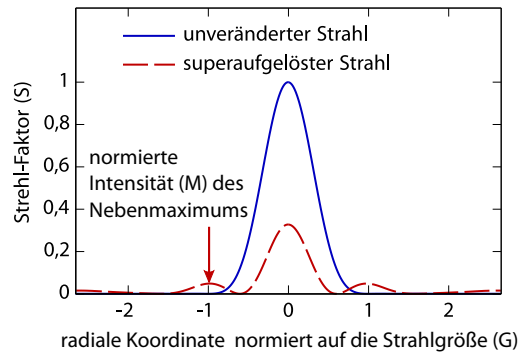


Abbildung 1.3: Beispiel für die Intensitätsverteilung in der Fokusebene für einen unveränderten Strahl und einen superaufgelösten Strahl.

Typische Beispiele für die Entwicklung des Fokusvolumens in Abhängigkeit der Phasenringbreite Δr sind anhand von Querschnitten in der x - y - und x - z -Ebene in Abbildung 1.4 dargestellt. Mit steigendem Δr verringert sich die Strahlbreite in der x - y -Ebene, bei gleichzeitiger Vergrößerung der Fokuslänge in der x - z -Ebene. Diese Querschnitte wurden für eine NA 0,8 mit dem vektoriellen Debye-Integral berechnet, siehe Abschnitt ??.

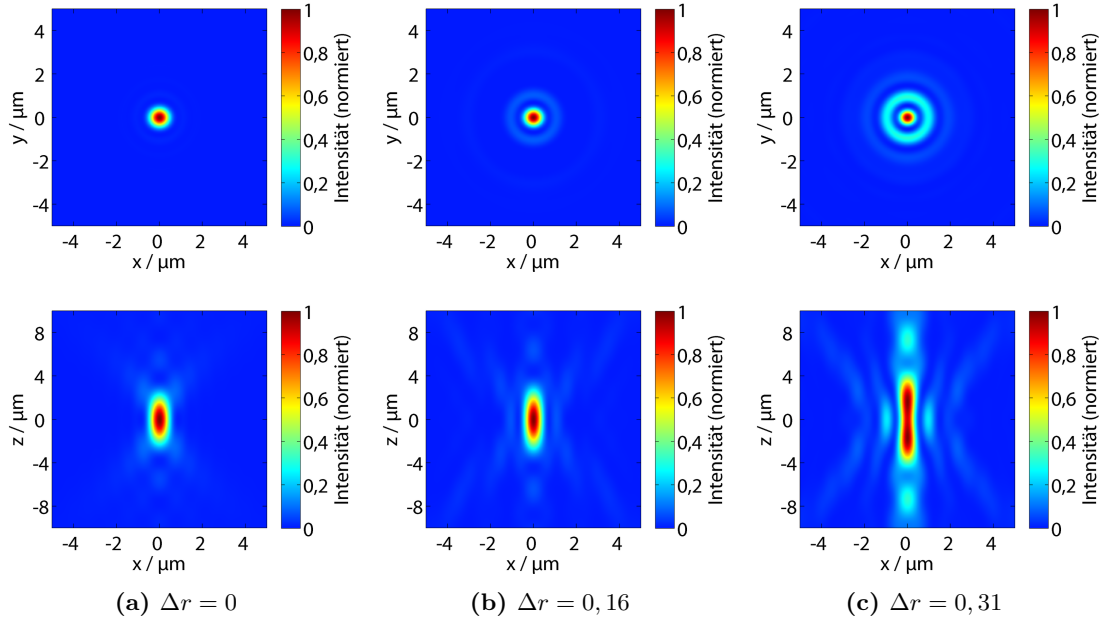


Abbildung 1.4: Querschnitte des Fokusvolumens in der $x-y$ -Ebene (oben) und der $x-z$ -Ebene (unten) für verschiedene Phasenringbreiten Δr mit $r_a = 0,16$. Die Querschnitte wurden im Rahmen der nichtskalaren Beugungstheorie für eine Fokussierung mit NA 0,8 nach der Debye-Näherung berechnet, siehe Gleichung (??).

Um die bestmöglichen Werte der Radien r_a und r_b zu bestimmen, wurden die Ergebnisse für G , S und M für den gesamten Parameterraum berechnet. Die Werte wurden über die Gleichung (??), der Näherung der Fresnel-Gleichung für radialsymmetrische Probleme, berechnet, da ein Vergleich mit den Ergebnissen der vektoriellen Theorie keine Unterschiede zeigte. Innerhalb dieses Parameterraums ergibt die Auswertung für Radien $r_a < 0,3$ und $r_a < r_b < 0,4$, also im Bereich kleiner Radien, die besten Ergebnisse. Für die weiteren Untersuchungen wurde r_a auf 0,16 festgelegt und das Verhalten an dieser Stelle für eine Variation von Δr untersucht.

Literatur

- [And92] HIDEO ANDO: „Phase-Shifting Apodizer of Three or More Portions“. *Japanese Journal of Applied Physics* (1992), Bd. 31(Part 1, No. 2B): S. 557–567 (siehe S. 2).
- [Boy02] GILBERT BOYER: „New class of axially apodizing filters for confocal scanning microscopy“. *J. Opt. Soc. Am. A* (2002), Bd. 19(3): S. 584–589 (siehe S. 2).
- [Cox84] INGEMAR J. COX: „Increasing the bit packing densities of optical disk systems“. *Appl. Opt.* (1984), Bd. 23(19): S. 3260–3261 (siehe S. 2).
- [GHR05] PHANINDRA NARAYAN GUNDU, ERWIN HACK und PRAMOD RASTOGI: „Apodized superresolution - concept and simulations“. *Optics Communications* (2005), Bd. 249(1-3): S. 101–107 (siehe S. 2).
- [Hec01] EUGENE HECHT: *Optics (4th Edition)*. 4. Aufl. Addison Wesley, 12.2001 (siehe S. 2).
- [Jua03] DANIEL M. de JUANA, JOSÉ E. OTI, VIDAL F. CANALES und MANUEL P. CAGIGAL: „Transverse or axial superresolution in a 4Pi-confocal microscope by phase-only filters“. *J. Opt. Soc. Am. A* (2003), Bd. 20(11): S. 2172–2178 (siehe S. 2).
- [Jua04] de JUANA, V. F. CANALES, P. J. VALLE und M. P. CAGIGAL: „Focusing properties of annular binary phase filters“. *Optics Communications* (2004), Bd. 229: S. 71–77 (siehe S. 2).
- [KRF01] K. KÖNIG, I. RIEMANN und W. FRITZSCHE: „Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses“. *Opt. Lett.* (2001), Bd. 26(11): S. 819–821 (siehe S. 2).
- [Kue10] K. KUETEMEYER, R. REZGUI, H. LUBATSCHOWSKI und A. HEISTERKAMP: „Influence of laser parameters and staining on femtosecond laser-based intracellular nanosurgery“. *Biomed. Opt. Express* (2010), Bd. 1(2): S. 587–597 (siehe S. 2).
- [LYJ06] HAITAO LIU, YINGBAI YAN und GUOFAN JIN: „Design and experimental test of diffractive superresolution elements“. *Appl. Opt.* (2006), Bd. 45(1): S. 95–99 (siehe S. 2).
- [Liu08] LINBO LIU, FRÉDÉRIC DIAZ, LIANG WANG, BRIGITTE LOISEAUX, JEAN-PIERRE HUIGNARD, C. J. R. SHEPPARD und NANGUANG CHEN: „Super-resolution along extended depth of focus with binary-phase filters for the Gaussian beam“. *J. Opt. Soc. Am. A* (2008), Bd. 25(8): S. 2095–2101 (siehe S. 2).

- [Pos11] MATTHIAS POSPIECH, MORITZ EMONS, KAI KUETEMEYER, ALEXANDER HEISTERKAMP und UWE MORGNER: „Superresolved femtosecond laser nanosurgery of cells“. *Biomed. Opt. Express* (2011), Bd. 2(2): S. 264–271 (siehe S. 1).
- [SM97] TASSO R. M. SALES und G. MICHAEL MORRIS: „Fundamental limits of optical superresolution“. *Opt. Lett.* (1997), Bd. 22(9): S. 582–584 (siehe S. 2, 3).
- [SK96] MASAHISA SHINODA und KENJIRO KIME: „Focusing Characteristics of an Optical Head with Superresolution Using a High-Aspect-Ratio Red Laser Diode“. *Japanese Journal of Applied Physics* (1996), Bd. 35(Part 1, No. 1B): S. 380–383 (siehe S. 2).
- [Vog05] A. VOGEL, J. NOACK, G. HÜTTMAN und G. PALTAUF: „Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues“. *Applied Physics B: Lasers and Optics* (8 2005), Bd. 81. 10.1007/s00340-005-2036-6: S. 1015–1047 (siehe S. 2).
- [WG01] HAIFENG WANG und FUXI GAN: „High Focal Depth with a Pure-Phase Apodizer“. *Appl. Opt.* (2001), Bd. 40(31): S. 5658–5662 (siehe S. 2).
- [WH99] MICHAEL R. WANG und XU GUANG HUANG: „Subwavelength-Resolvable Focused Non-Gaussian Beam Shaped With a Binary Diffractive Optical Element“. *Appl. Opt.* (1999), Bd. 38(11): S. 2171–2176 (siehe S. 2).