Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik

an der Universität Ulm

(Direktor: Prof. Dr. R. Steiner)

Entwicklung eines Infrarot-Lasersystems zur thermischen Mikromanipulation von Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Martin Edelmann

aus Aalen

Mai 2001

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. P. Gierschik
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Steiner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Hibst
Tag der Promotion:	13. Juli 2001

Für meine Familie

Wenn die Menschen nur über das sprächen, was sie begreifen,
dann würde es sehr still auf der Welt sein.

Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **5**

2. Biologische Fragestellungen **8**

2.1. Nekrose, Apoptose und Genexpression 8

2.1.1. Nekrose 8

2.1.2. Apoptose 9

2.1.3. Gen-Expression 9

2.2. Laser-Mikrodissektion 9

3. Simulation laserinduzierter Wärmeverteilungen **11**

3.1. Modellannahmen 11

3.1.1. Modell eines Zellverbands auf einem Trägersubstrat 11

3.1.2. Berücksichtigung der Ablation 12

3.1.3. Im Modell verwendete Parameter 13

3.2. Licht-Materie-Wechselwirkungen 14

3.2.1. Reflexion 14

3.2.2. Absorption und Transmission 15

3.2.3. Streuung und Remission 16

3.3. Computersimulation 17

3.3.1. Feste Parameter 17

3.3.2. Zu variierende Parameter 17

3.3.3. Ergebnisse 17

3.4. Anforderungen an das Lasersystem 23

3.4.1. Wellenlänge 23

3.4.2. Zu verwendende Leistungen und Energien 24

3.4.3. Fokussierung 24

4. Diodengepumpte cw-Laser im mittleren Infrarot **26**
4.1. Theoretischer Hintergrund 26
4.2. Stand der Technik 27
4.2.1. Pumpanordnungen 27
4.2.2. Laserkristalle 29

5. Auslegung des Laserresonators **30**
5.1. Rechenmethode 30
5.2. Resonatordesign 30
5.2.1. Laserkristall 30
5.2.2. Pumpfokus 31
5.2.3. Laserspiegel 31
5.2.4. Resonatorlänge 35
5.2.5. Designfestlegung 36
5.3. Erwartete Strahlparameter 36

6. Aufbau des Lasersystems **38**
6.1. Experimentalaufbau des Lasers 38
6.2. Fokussierung der Laserstrahlung 40
6.2.1. Fokussiermethoden 41
6.2.2. Verwendete Fokussieranordnung 42
6.3. Eigenschaften des Lasers: 46
6.3.1. Leistung 47
6.3.2. Zeitliches Verhalten 47
6.3.3. Strahlkaustik 49
6.3.4. Zusammenfassung 53

7. Gesamtsystem für die Mikromanipulation **54**
7.1. Konzeption und Aufbau 54
7.2. Optische Eigenschaften 55
7.2.1. Bildqualität 55
7.2.2. Laserfokus und Zielstrahl 57

8. Vergleich zwischen thermischer Simulation und Experiment **59**
8.1. Arrhenius-Formalismus 60
8.2. Experiment zur Eiweißkoagulation im Vergleich zur Simulation 63

9. Anwendungsbeispiele **69**
9.1. Großflächige Bestrahlung von Zell-Monolayern 69
9.2. Schneidversuche 72
9.2.1. Gelunterstützte Schnitte 73
9.2.2. Schneiden von Zwiebel-Epidermiszellen 74
9.2.3. Schnitte in Gewebe 75

10. Zusammenfassung und Ausblick **77**

Danksagung **79**

A. Anhang **80**
A.1. Kurzbeschreibung des Programms *Megauss* 80
A.2. Diodenspektren und Temperaturabhängigkeit 82
A.3. Aufbau und Schaltung der Pumpeinheit 83
A.4. Untersuchung alternativer Laserkristalle 84
A.5. Justagekonzepte 85
A.5.1. Laser 85
A.5.2. Fokussierung 86

Literaturverzeichnis **87**

Abbildungsverzeichnis **90**

Tabellenverzeichnis **93**

Index **94**

1. Einleitung

Bereits kurz nach der Entwicklung des ersten Rubinlasers 1960 wurden Laser in medizinischen Bereichen eingesetzt [9]. Heute gehört der therapeutische Lasereinsatz bei vielen Erkrankungen zum Alltag, sei es in der Ophthalmologie, Dermatologie, Chirurgie oder in zunehmendem Maße in der Zahnheilkunde. Es sind vor allem die weit verbreiteten Erkrankungen, die die Entwicklung immer neuer Lasersysteme vorwärtstreiben. Beispielsweise ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) weltweit die häufigste Erblindungsursache. Die Industrie entwickelt daher seit Jahren Lasersysteme, die über einen photodynamischen Ansatz eine Therapierbarkeit dieser Erkrankung ermöglichen.

Ganz anders liegen die Dinge im Bereich der Biologie, bei der bisher kein größerer Markt bedient werden musste. Lasersysteme, wie z.B. Laserscanning-Mikroskope blieben der oft universitären Forschung vorbehalten. Der massive Aufschwung der Biotechnologie in den letzten Jahren änderte die Situation jedoch grundlegend. Schlagworte wie Biochip, Screening oder High-Throughput verdeutlichen den Trend hin zu schnellen automatisierten Systemen. In der Medizin unterscheidet man zwischen diagnostischen und therapeutischen Laserverfahren. Analog kann in der Zellbiologie auf mikroskopischer Ebene zwischen beobachtenden und manipulatorischen Verfahren unterschieden werden. Während im ersteren Fall möglichst keine Veränderung an der biologischen Probe erfolgen soll, wie z.B. bei der Fluoreszenzspektroskopie, verändert die Laserstrahlung bei den manipulatorischen Verfahren mehr oder weniger die Probe, wobei vielerlei Wechselwirkungsmechanismen ausgenützt werden können. So wird mit der Laserpinzette mechanisch der Ort eines Objektes verändert [7] oder mit UV-Mikrodissektionslasern zellchirurgisch gearbeitet, z.B. beim Schneiden von Chromosomen. Das in dieser Arbeit entwickelte Lasersystem gehört zur manipulatorischen Gruppe, wobei es ausschließlich um thermische Wechselwirkungen geht. Je nach Laserleistung und Fokusdurchmesser können unterschiedliche Effekte erzielt werden, die stimulatorisch oder dissektorisch sein können. Zu den thermischen Zellstimulationen zählen alle molekularbiologischen Reak-

tionsmechanismen, die durch Wärme ausgelöst werden, während es bei der Dissektion um das Schneiden von biologischem Material geht. Die biologischen Fragestellungen bilden zwar nicht das Thema, jedoch die Motivation der Arbeit, weshalb sie in Kapitel 2 kurz skizziert werden.

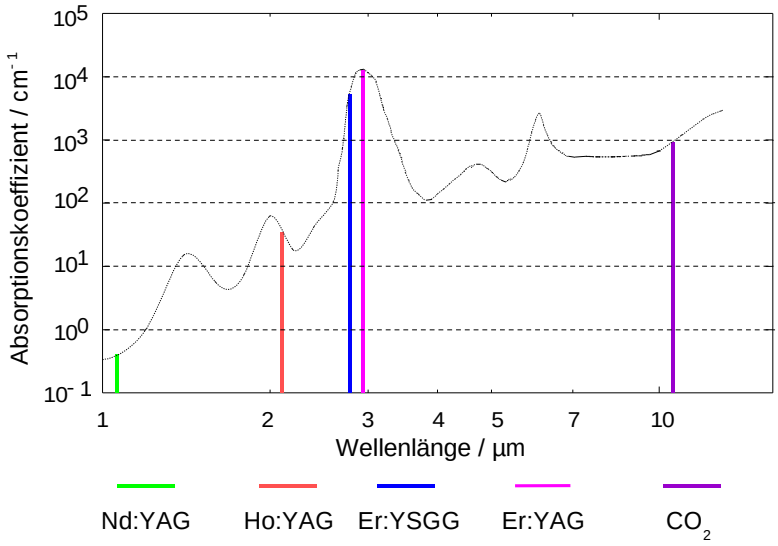


Abb. 1.1.: *Absorptionsspektrum von Wasser im Infrarot und einige typische Laser-Wellenlängen (aus [10] nach Daten von [32])*

Bei der Entwicklung eines Lasersystems für die Stimulation von Zellkulturen und Einzelzellen ist die Wahl der Laser-Wellenlänge von entscheidender Bedeutung. Da es primär um einen Wärmestimulus geht und zumindest Lebendzellen zu einem großen Teil aus Wasser bestehen, ergeben sich erste Entscheidungshilfen aus dem Wasser-Absorptionsspektrum (Abb. 1.1). Da die Dicke des Zellmaterials bei Monolayern nur wenige Mikrometer beträgt, ist eine entsprechend geringe Eindringtiefe der Strahlung wünschenswert, was bei einer Wellenlänge um 3 µm gegeben ist. Eine ausreichend hohe Absorption gäbe es auch bei Wellenlängen über 10 µm. R. Ferrando et al. bestrahlten z.B. Zellen mit einem CO_2-Laser bei 10,6 µm [5]. Allerdings ist die Fokussierung einer solch langwelligen Strahlung auf eine Einzelzelle dann praktisch nicht mehr möglich. Im nicht dargestellten ultravioletten Spektralbereich hat Wasser zwar auch einen relativ hohen Absorptionskoeffizienten. Dieser Bereich kommt aber wegen der eventuellen mutagenen Wirkung von UV-Strahlung nicht in Frage.

Im Gegensatz zum Wärmebad kann der Laser eine inhomogene Temperaturverteilung erzeugen. Im Extremfall kann versucht werden, den Wärmeeintrag auf eine Einzelzelle zu beschränken. Dabei stellt sich die Frage, welche Temperaturverteilungen zu erwarten sind und wie sie beeinflusst werden können. Sowohl für kontinuierliche als auch gepulste Bestrahlung werden hierzu in Kapitel 3 Simulationsrechnungen vorgestellt. Dieses Kapitel wurde bewusst den Kapiteln zur Laserentwicklung vorangestellt, denn die Ergebnisse der Simulationen bildeten die Spezifikation für das zu entwickelnde Lasersystem.

Die nächsten Kapitel behandeln die eigentliche Laserentwicklung ausgehend von theoretischen Grundlagen über Resonatorberechnungen bis hin zur Adaption des Lasersystems an das Mikroskop.

Der experimentelle Nachweis für die Gültigkeit der thermischen Simulationen ist in Kapitel 8 anhand eines Albumin-Modells wiedergegeben. Es wird gezeigt, wie der dabei verwendete Arrheniusformalismus sich auf Zellkulturen anwenden lässt, so dass eine Möglichkeit zur Klassifizierung von Zellen bezüglich thermisch induzierter Nekrose oder Apoptose geschaffen wird. In Kapitel 9 werden weitere Experimente mit biologischen Materialien beschrieben, bei denen der entwickelte Laser bislang zur Anwendung kam.

Aufgrund der unterschiedlichen Thematiken der einzelnen Abschnitte wurde auf eine zentrale Diskussion verzichtet und stattdessen die Ergebnisse im jeweiligen Kapitel bewertet und diskutiert.

Genauere technische Details zur entwickelten Software, zur Laserentwicklung, sowie Justageanweisungen finden sich im Anhang.

2. Biologische Fragestellungen

Die zellbiologischen Fragestellungen waren die Motivation für die Entwicklung eines IR-Lasers, der Zellschichten lokal erhitzen kann. Sie sind deshalb hier in aller Kürze zusammengefasst [16].

2.1. Nekrose, Apoptose und Genexpression

Die Reaktionsmechanismen von lebenden Zellen auf Wärmereize sind in weiten Teilen noch unverstanden. Der in dieser Arbeit entwickelte Laser kann zur Klärung der unterschiedlichen Prozesse beitragen, da er die Möglichkeit eröffnet, nur begrenzte Zellareale oder Einzelzellen zu erwärmen. Vorteile gegenüber anderen Erwärmungsmethoden sind z.B. die gezielte Behandlung einzelner Zellen in Mischkulturen und die Analyse interzellulärer Signaltransduktion.

Drei Reaktionen auf Wärme, die im Folgenden mit möglichen Nachweismethoden kurz erläutert werden, sind hierbei von besonderem Interesse.

2.1.1. Nekrose

Bei der Nekrose werden die Zellen durch die Wärmestrahlung direkt geschädigt. Proteine werden denaturiert, die Zellwände platzen auf und cytoplasmatische Komponenten können austreten. Eine mögliche Nachweismethode der Vitalität ist die Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau, das nur in eine Zelle eindringen kann, wenn die Zellmembran massiv geschädigt ist [24]. Mit Hilfe des Lasers können die Nekroseschwellen bei Zell-Monolayern bestimmt und miteinander verglichen werden.

2.1.2. Apoptose

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, läuft im Gegensatz zur Nekrose kontrolliert ab. Nach dem Apoptosesignal (in diesem Fall ein Wärmereiz) werden verschiedene Enzyme (Caspasen) aktiviert, die Proteine spalten können. Letztlich wird die Zelle in sog. apoptotische Körperchen zerlegt, die dann zumindest bei tierischen Zellen durch Phagocytose beseitigt werden. Für den sichtbaren Nachweis werden Fluoreszenztechniken eingesetzt, die verschiedene Caspasen im aktivierten Zustand nachweisen. Der IR-Laser ermöglicht Aufschlüsse über die Dynamik des Apoptosesignals, also über die Frage, wie lange der Reiz in welcher Stärke vorliegen muss, damit Apoptose ausgelöst wird.

2.1.3. Gen-Expression

Möglich ist auch die Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSP) als Antwort auf einen Wärmestress. Berühmt geworden ist hierbei die HSP70-Familie. In manchen Fällen können Hitzeschock-Proteine die Zelle eine Zeit lang vor einer Schädigung durch Hitze schützen. Von besonderem Interesse sind Tumorzellen, die über diesen Schutzmechanismus nicht verfügen und damit auf Hyperthermie empfindlich reagieren. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper durch Elektrophorese (Western-Blot) oder über Fluoreszenz. Wie im Fall der Apoptose interessieren auch hier die entsprechenden Zeitkonstanten der Reaktion.

2.2. Laser-Mikrodissektion

Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Lasern in der Zellbiologie ist die Mikrodissektion, d.h. das Ausschneiden und Herauslösen bestimmter Areale aus einem Zellverband [27]. Kommerzielle Laser-Mikrodissektions-Systeme arbeiten bislang mit Stickstofflasern im ultravioletten Spektralbereich bei einer Wellenlänge von 337 nm. Bei einer ausreichenden Energiedichte werden durch die Strahlung direkt Molekülbindungen aufgebrochen. In der Praxis wird das Schneiden durch spezielle Kunststoff-Folien unterstützt, auf denen das Zellmaterial liegt und die als Absorber dienen. Die Laserstrahlung lässt sich aufgrund der kleinen Wellenlänge auf einen Durchmesser von weniger als 1 µm fokussieren. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob bei der UV-Mikrodissektion mutagene Nebenwirkungen auftreten. Im Rahmen des Verbundprojekts „System zur IR-Laserstimulation molekularer Mechanismen in Einzelzellen und

im Zellverband“ wurde ein Mikrodissektions-System der Firma P.A.L.M. beschafft, an das der IR-Laser adaptiert werden sollte.

Eine spezielle Form einer IR-Mikrodissektion, die Laser Capture Microdissection (LCM), ist bereits von M. R. Emmert-Buck et al. beschrieben worden [4]. Hierbei liegt das Zellmaterial auf einer thermoplastischen Folie. An der mit einem CO_2-Laser bestrahlten Stelle bleiben die Zellen haften und werden mit der Folie abgelöst. In der vorliegenden Arbeit soll dagegen unter anderem untersucht werden, ob der Infrarotlaser auch für ein echtes „Schneiden“ (besonders von Lebendzellen) eingesetzt werden kann. Ein möglicher dahinter stehender physikalischer Prozess wäre die thermische Ablation, also das Verdampfen von Zellmaterial. Wie in Kap. 3 gezeigt wird, wäre hierfür eine gepulste Betriebsart des Lasers von Nutzen, was jedoch aus Kostengründen nicht realisiert werden konnte. Doch auch der kontinuierliche Laser lässt sich unter bestimmten Bedingungen zum Schneiden verwenden. Experimente hierzu sind in Kapitel 9.2 beschrieben. Ein Nachteil der langwelligen Strahlung ist die gegenüber der UV-Strahlung etwa 10 mal schlechtere Fokussierbarkeit, was ein genaues Schneiden erschwert.

3. Simulation laserinduzierter Wärmeverteilungen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit es gelingen kann, einzelne Zellen oder zumindest eng begrenzte Zellareale zu erhitzen, ohne die Umgebung in nennenswertem Maße mit zu erwärmen. Neben den Fokuseigenschaften des Laserstrahls spielt hier in erster Linie die Wärmediffusion eine Rolle. Für die Berechnung der zu erwartenden Wärmeverteilungen wird ein am ILM entwickeltes Finite-Differenzen-Programm („*Dermheat*“) verwendet, das mittlerweile in der Version 2.0 vorliegt. Das Programm eignet sich besonders für zylindergeometrische Anordnungen, was im vorliegenden Fall gegeben ist.

Mit Vorgriff auf Kenntnisse über verfügbare Laserkristalle im mittleren Infrarot (Kap. 4.2.2) wurde in den Simulationen mit einer Laserwellenlänge von 2,8 µm gerechnet. Desweiteren wurde angenommen, dass eine beugungsbegrenzte Strahlqualität vorliegt, so dass bei einer numerischen Apertur von 0,5 theoretisch ein Fokusdurchmesser von unter 6 µm erreichbar ist (vgl. Kap. 6.2).

3.1. Modellannahmen

3.1.1. Modell eines Zellverbands auf einem Trägersubstrat

Um die Computersimulation in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wird von einem vereinfachten Modell ausgegangen (siehe Abb. 3.1). Die Zellschicht wird als homogen mit einer Dicke von 5 µm angenommen. Als Trägersubstrat kommen in der Praxis Glas, Folien u.Ä. in Frage. Die Leistungsdichte des senkrecht auf die Zellschicht auftreffenden Laserstrahls sei

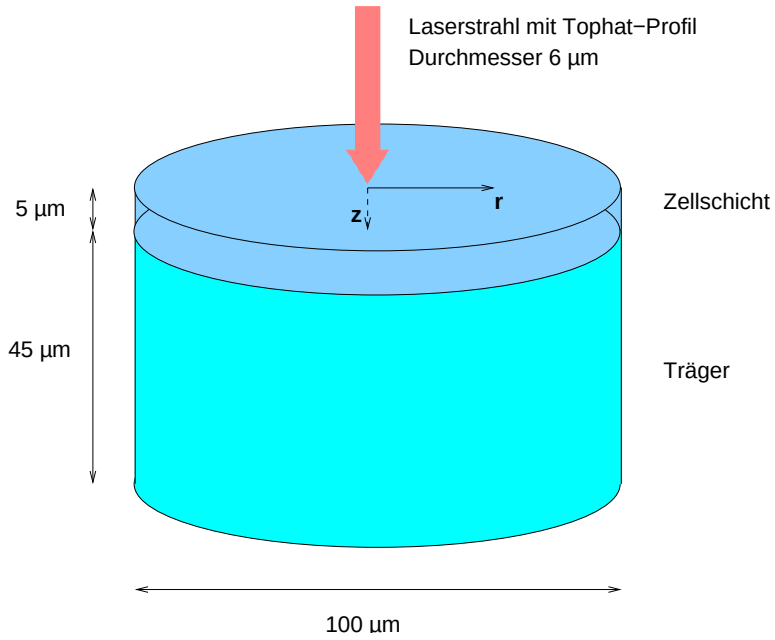


Abb. 3.1.: *Modell einer einlagigen Zellschicht auf einem Trägersubstrat*

über den Strahldurchmesser von 6 µm konstant (Tophat-Profil). In Abb. 3.1 sind bereits einige der in der Rechnung verwendeten Maße sowie das verwendete Koordinatensystem eingetragen. In der Praxis sind die Träger dicker als die in der Simulation berücksichtigten 45 µm. Auch die laterale Ausdehnung ist wesentlich größer als 100 µm. Für die Simulation genügt es jedoch, sich auf den Raum zu beschränken, in dem bedeutendere Temperaturgradienten zu erwarten sind.

3.1.2. Berücksichtigung der Ablation

In einem weiteren Schritt soll versucht werden, das Modell dahingehend zu variieren, dass ein Ablationsprozess berücksichtigt wird. In der Realität wird die Strahlung ein Gauß[1]-ähnliches Profil besitzen, wobei nur der zentrale Bereich ablativ wirksam wird. Es wird daher stark vereinfacht und willkürlich angenommen, dass ein Bereich von 4 µm Durchmesser bereits ablatiert ist und nur ein „Ring“ mit einer Breite von 1 µm durch den dort auftreffenden Strahlungsanteil erwärmt wird. In Abb. 3.2 ist dieser Fall in einem Ausschnitt dargestellt.

[1] Carl Friedrich Gauß, 1777-1855, dt. Mathematiker

Trotz dieses Abtrags wird in der Simulation das Strahlprofil weiterhin als Tophat-Profil angenommen.

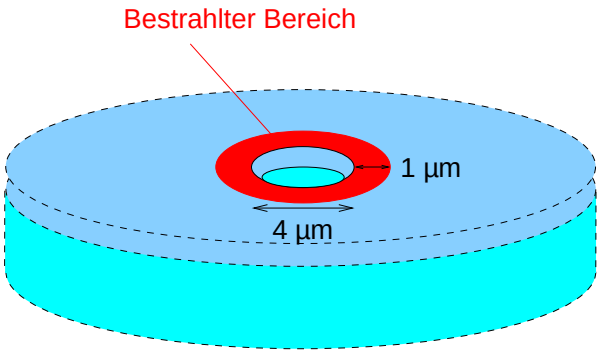


Abb. 3.2.: *Modell einer einlagigen Zellschicht auf einem Trägersubstrat mit ablatiertem Bereich*

3.1.3. Im Modell verwendete Parameter

Für die Modellrechnungen wurden einige optische und thermische Parameter der beteiligten Materialien verwendet. Sie sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Für das Cytoplasma kann aufgrund des hohen Wasseranteils (75-95%) näherungsweise von den bekannten Materialparametern für Wasser ausgegangen werden.

Drei verschiedene Trägermaterialien werden in den Berechnungen berücksichtigt. Stellvertretend für Objektträger-Glas steht BK7 der Firma Schott. In Tab. 3.1 sind zum Vergleich die thermischen Parameter eines Objektträger-Glases der Firma Marienfeld eingetragen. Sie unterscheiden sich nicht wesentlich von den in den Simulationen verwendeten Werten für BK7.

Als weitere Materialien wurden zwei Extremfälle gewählt: Saphir besitzt eine besonders hohe Wärmeleitfähigkeit. Es ist zu erwarten, dass damit die Wärme am engsten lokalisiert werden kann, da die Zellen in der Umgebung der Bestrahlung durch das Saphir gekühlt werden. Das andere Extrem ist die Annahme, dass der Träger ebenfalls aus Wasser besteht und damit eine wesentlich schlechtere Wärmeleitfähigkeit als BK7-Glas aufweist. Das dadurch gänzlich aus Wasser bestehende Modell entspricht einer dicken Zellschicht, an deren oberen Rand die IR-Strahlung vollständig absorbiert wird.

Tabelle 3.1.: *In der Simulation verwendete Parameter. Die Werte für Saphir entstammen [25], für BK7-Glas [26] und für Objektträger dem Datenblatt des Herstellers Marienfeld GmbH. Die Absorptionskoeffizienten für BK7 und Objektträgerglas wurden anhand eigener Messungen abgeschätzt. Der Absorptionskoeffizient für Wasser ist nach Abb. 1.1 angegeben.*

Material	Absorptions-koeffizient [cm^{-1}] bei 2,8 µm	Wärmeleit-fähigkeit [W/(m·K)]	Spezifische Wärme [J/(kg·K)]	Material-dichte [kg/m^3]	Brech-zahl
Wasser	5160	0,6	4187	1003	1,33
BK7 als Träger	1,2	1,114	858	2510	1,5
Objektträger	1,6	1,1	856	2479	1,5
Saphir als Träger	$< 0{,}1$	40	750	3970	1,77

3.2. Licht-Materie-Wechselwirkungen

Wenn Licht auf ein Material trifft oder in das Material eindringt, sind mehrere Wechselwirkungs-Mechanismen möglich:

1. Reflexion: Das Licht wird direkt an der Materialoberfläche zurückgeworfen.
2. Absorption: Das Licht wird absorbiert .
3. Transmission: Das Licht durchdringt das Material und verlässt es auf der dem Lichteinfall gegenüberliegenden Seite .
4. Streuung: Das Licht erfährt im Material eine Richtungsänderung.
5. Remission: Das Licht verlässt nach einem oder mehreren Streuereignissen das Material auf der Einfallsseite.

3.2.1. Reflexion

Im beschriebenen Modell kommt es zu Reflexionen an den Grenzflächen zwischen Luft und Wasser einerseits und Wasser und Trägermaterial andererseits. Für den an einer Grenzfläche

reflektierten Anteil einer senkrecht einfallenden Welle der Intensität I_0 folgt aus den Fresnelschen[2] Formeln (siehe z.B. [1]):

$$I_r = I_0 \cdot \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}\right)^2 \tag{3.1}$$

mit n_1 und n_2 als den Brechzahlen der beteiligten Materialien.

Bei Verwendung der in Tab. 3.1 angegebenen Brechzahlen bedeutet das einen reflektierten Anteil von 2% an der Grenzfläche Luft-Wasser und 0,4% (BK7) bzw. 2% (Saphir) an der Grenze zum Trägermaterial. In der Simulation werden diese geringen Reflexionsanteile nicht weiter berücksichtigt.

3.2.2. Absorption und Transmission

Bei Vernachlässigung von Streuung und Remission (s.u.) kann die Absorption gemäß dem Lambert[3]-Beerschen[4] Gesetz berechnet werden. Mit dem Absorptionskoeffizienten α gilt:

$$I(z) = I_0 \, e^{-\alpha z} \tag{3.2}$$

Der transmittierte Anteil schließlich berechnet sich aus der nach Durchlaufen des Materials verbleibenden Lichtintensität.

Im Beispiel der bereits erwähnten Zellschicht der Dicke $l_z = 5\,\mu\text{m}$ erhält man

$$I(l_z) = I_0 \, e^{-5160\,cm^{-1} \cdot 5\,\mu\text{m}} \approx 0,076 \cdot I_0 \tag{3.3}$$

mit α =5160 cm^{-1} als Absorptionskoeffizient für Wasser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 2,8\,\mu\text{m}$. Das bedeutet, dass 7.6% der Ausgangsleistung transmittiert wird und in das Trägermaterial eintritt. Dort verhält sie sich dann wiederum gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz, wobei diesmal der Absorptionskoeffizient des Trägermaterials zu verwenden ist. Aufgrund der im Modell klein gewählten Dicke des Trägers geht jedoch (außer im Falle von Wasser) dieser Anteil weitgehend durch den Träger hindurch und trägt damit nicht mehr zu einer Temperaturerhöhung bei.

[2] Augustin J. Fresnel, 1788-1827, franz. Physiker
[3] Johann Heinrich Lambert, 1728-1777, dt. Physiker
[4] August Beer, 1825-1863, dt. Physiker

3.2.3. Streuung und Remission

In einem streuenden Medium erfährt eine einfallende Welle entlang der Einfallsrichtung (optische Achse) aufgrund von Streuverlusten eine Abschwächung, die in einfacher Näherung analog zu Gl. (3.2) durch ein Exponentialgesetz beschrieben werden kann. Ist I_0 die Anfangsintensität, so gilt für die abgeschwächte Intensität I an einem Ort z [20]:

$$I(z) = I_0 \, e^{-(1-g)\alpha_s z} \tag{3.4}$$

Hierbei ist α_s der Streukoeffizient. Der g-Faktor berücksichtigt eventuelle Anisotropien der Streuung.

Für den Streukoeffizienten von Cytoplasma wird angenommen, dass er nicht höher ist als im IR für Gewebe üblich [10]: $\alpha_s < 100\,\mathrm{cm}^{-1}$. Desweiteren soll von einer isotropen Streuung (Rayleighstreuung[5]) ausgegangen werden: $g = 0$.

Nach Durchlaufen einer Zellschicht der Dicke $l_z = 5\,\mu\mathrm{m}$ beträgt dann die Intensität:

$$I(l_z) > I_0 \, e^{-100\,cm^{-1}\cdot 5\,\mu\mathrm{m}} \approx 0,95 \cdot I_0 \tag{3.5}$$

Der Vergleich von Gl. (3.5) mit Gl. (3.3) zeigt, dass die Streuung gegenüber der Absorption vernachlässigbar ist. Noch deutlicher wird dies anhand der mittleren freien Weglänge. Sie beträgt bei der Absorption etwa $2\,\mu\mathrm{m}$ im Vergleich zu mindestens $100\,\mu\mathrm{m}$ bei der Streuung. Dies deckt sich auch mit Ergebnissen von M. Patterson et al., nach denen in Gewebe ab $\lambda = 2,7\,\mu\mathrm{m}$ die Streuung vernachlässigt werden kann [22].

Da die Remission auf Streuereignissen beruht, gilt die Vernachlässigung hier analog.

[5] John W. S. Rayleigh, 1842-1919, engl. Physiker

3.3. Computersimulation

3.3.1. Feste Parameter

Folgende Parameter werden dem Simulationsprogramm zur Verfügung gestellt und konstant belassen:

- Materialparameter wie in Tab. 3.1.
- Zylindersymmetrische Geometrie wie in Abb. 3.1 mit einem Netz von 50 µm x 50 µm (Radiale Breite x Höhe) und einer Voxelgröße von 1 µm x 1 µm.
- Tophat-Geometrie des einfallenden Laserstrahls mit einem Strahldurchmesser von 6 µm. Die Wellenlänge betrage 2,8 µm.
- Die Ausgangstemperatur aller Materialien ist 25°C.

3.3.2. Zu variierende Parameter

Variiert werden die Laserleistung bzw Laserenergie, Pulsdauern, Trägermaterialien, sowie die Einstrahlrichtung .

- Folgende Betriebsmodi des Lasers werden simuliert: 150 µW - cw, 1 mW - 1 ms, 10 mW - 100 µs, 100 mW - 10 µs. Das heißt, bei den gepulsten Betriebsarten wird die Pulsenergie konstant bei 1 µJ belassen.
- Verwendete Trägermaterialien sind Glas (BK7), Saphir und Wasser.
- Alternativ zu einer Bestrahlung des biologischen Materials „von oben“ (wie in Abb. 3.1 dargestellt) kann auch eine Bestrahlung „von unten“, d.h. durch das Trägermaterial hindurch erfolgen. Der Ort der größten Wärmeentwicklung wird sich dann direkt an der Grenzfläche zwischen Zellschicht und Träger befinden und eine gute Wärmeableitung ermöglichen. Es soll untersucht werden, ob dadurch eine noch begrenztere Lokalisierung des Wärmeeintrags erzielt werden kann.

3.3.3. Ergebnisse

Ein wichtiger Untersuchungsgegenstand ist die Frage, wie stark sich bei der Bestrahlung einer einzelnen Zelle die Umgebung mit erwärmt. Hierzu wird willkürlich ein mittlerer Zellabstand

im Monolayer von 9 µm angenommen. Der im Folgenden häufig vorkommende Referenzpunkt in einer Entfernung von 9 µm vom Einstrahlzentrum steht also stellvertretend für eine „Nachbarzelle“.

cw-Betrieb „von oben“: Bei einer Dauerstrichbestrahlung mit 150 µW Leistung wird nach wenigen Millisekunden ein thermisches Gleichgewicht erreicht. Für die verschiedenen Trägermaterialien sind in Abb. 3.3 die Temperaturen im Zentrum der Bestrahlung und in einer lateralen Entfernung von 9 µm aufgetragen.

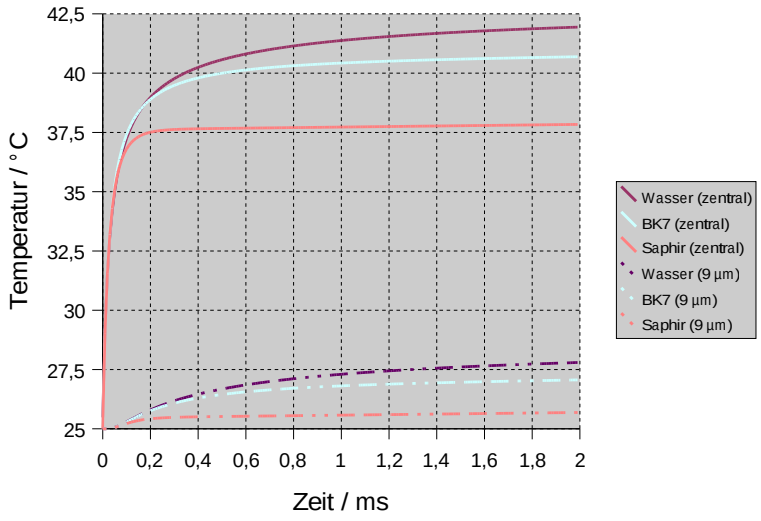


Abb. 3.3.: *Zeitliche Temperaturverläufe bei einer cw-Einstrahlung mit 150 µW*

Die höhere Wärmeleitfähigkeit von Saphir macht sich auf zwei Weisen bemerkbar:

1. Die absoluten Temperaturen liegen niedriger.
2. Auch die Temperaturerhöhung des 9 µm entfernten Punktes relativ zur zentralen Temperaturerhöhung liegt günstig (5,4% im Gegensatz zu 13,1% bei BK7 und 16,5% bei Wasser).

Abb. 3.4 zeigt am Beispiel von Saphir die nach 2 ms erreichte Temperaturverteilung. Man beachte, dass in dieser Darstellung die Temperatur über r und z aufgetragen ist, also über die radiale und axiale Koordinate (vgl. Abb. 3.1).

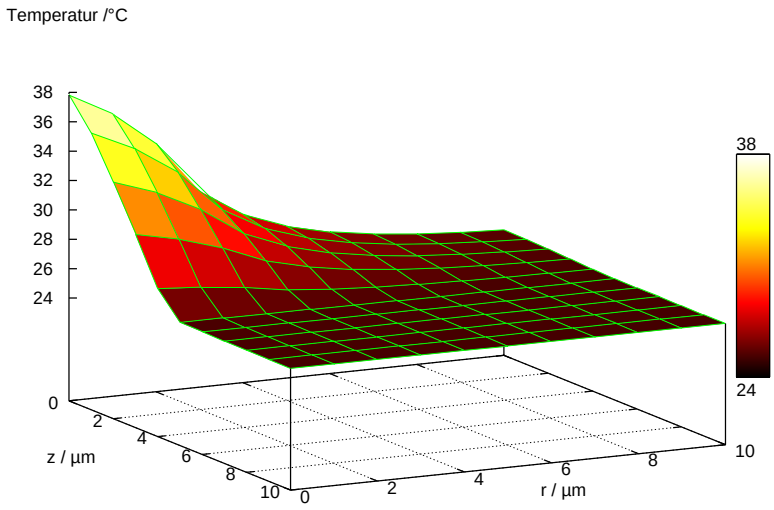


Abb. 3.4.: *Temperaturverteilung nach 2 ms cw-Einstrahlung mit 150 µW bei Verwendung von Saphir*

Gepulste Betriebsarten „von oben“: Die Abbildungen 3.5 bis 3.7 zeigen die Ergebnisse in den gepulsten Betriebsarten.

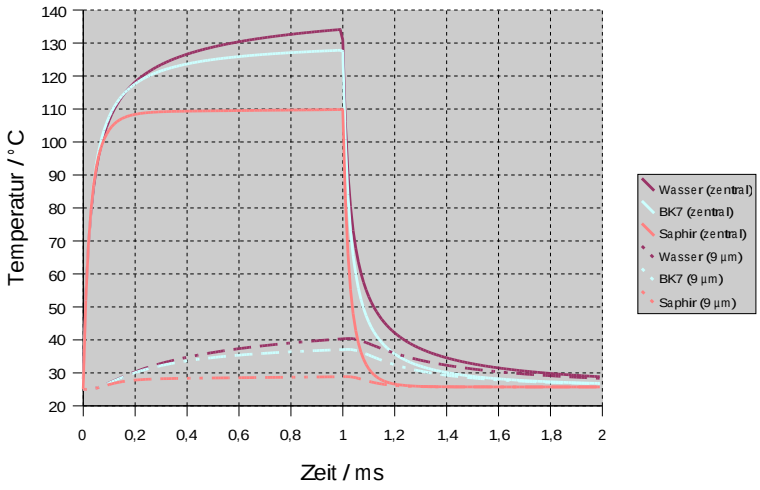


Abb. 3.5.: *Zeitliche Temperaturverläufe bei einem 1 ms-Puls mit 1 µJ*

Da die Pulsenergie in allen Fällen konstant 1 µJ betrug, ergeben sich um so höhere Temperaturen, je kürzer die Pulsdauer gewählt wird. Bei Temperaturen über 100°C wird in der Praxis eine Wasserverdampfung einsetzen, die für einen Kühleffekt sorgt, der in der Simulation nicht

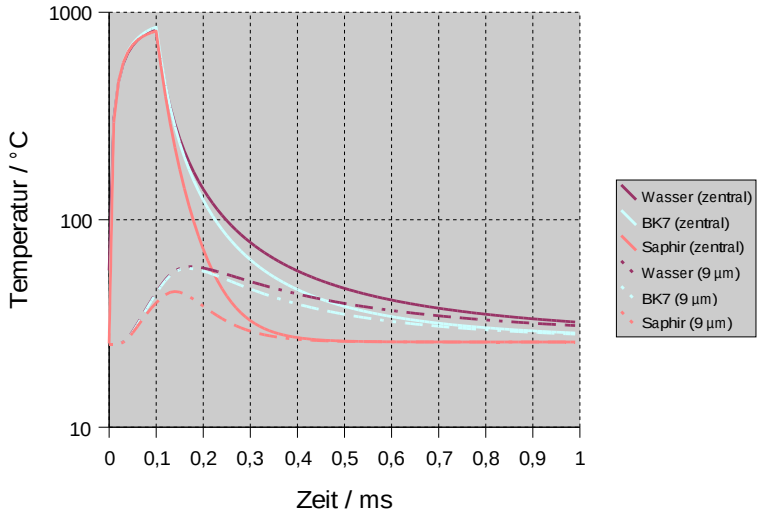


Abb. 3.6.: *Zeitliche Temperaturverläufe bei einem 100 µs-Puls mit 1 µJ*

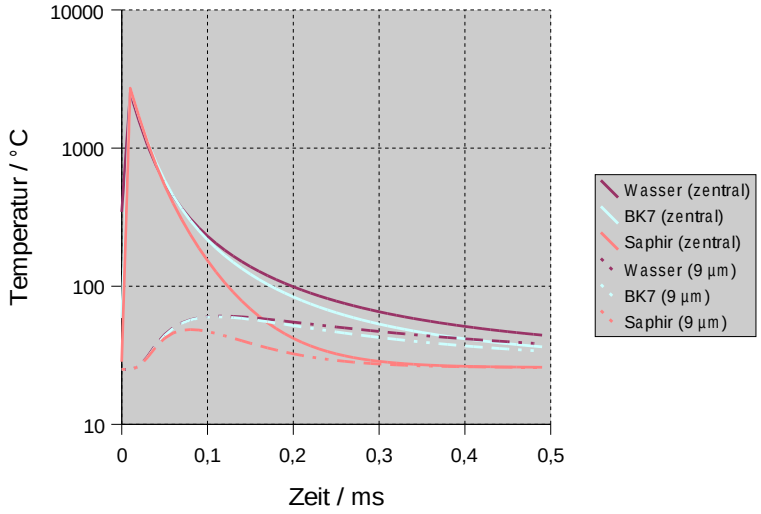


Abb. 3.7.: *Zeitliche Temperaturverläufe bei einem 10 µs-Puls mit 1 µJ*

berücksichtigt ist. Im Vergleich zwischen den verschiedenen Trägermaterialien schneidet wieder Saphir mit seiner hohen Wärmeleitfähigkeit am besten ab.

Einstrahlung „von unten“: Bei einer Bestrahlung der Probe durch das Trägermaterial hindurch ergeben sich Temperaturverläufe wie in Abb. 3.8 und 3.9 dargestellt.

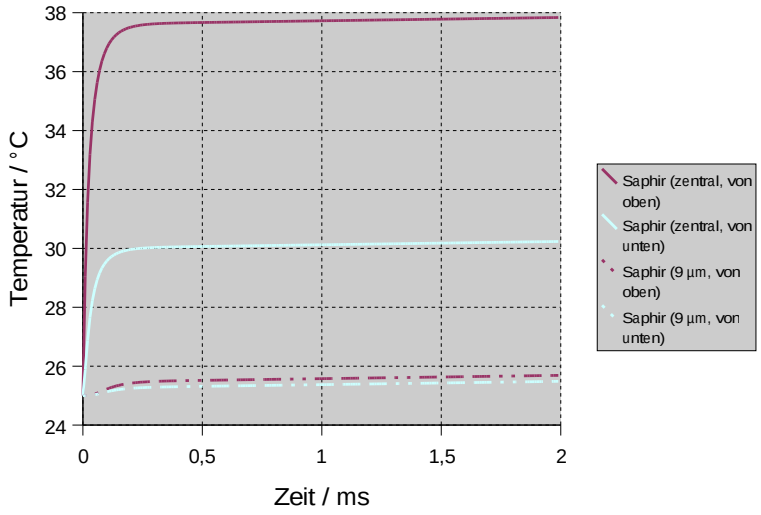


Abb. 3.8.: *Zeitliche Temperaturverläufe bei einer cw-Einstrahlung mit 150 µW durch das Trägermaterial hindurch*

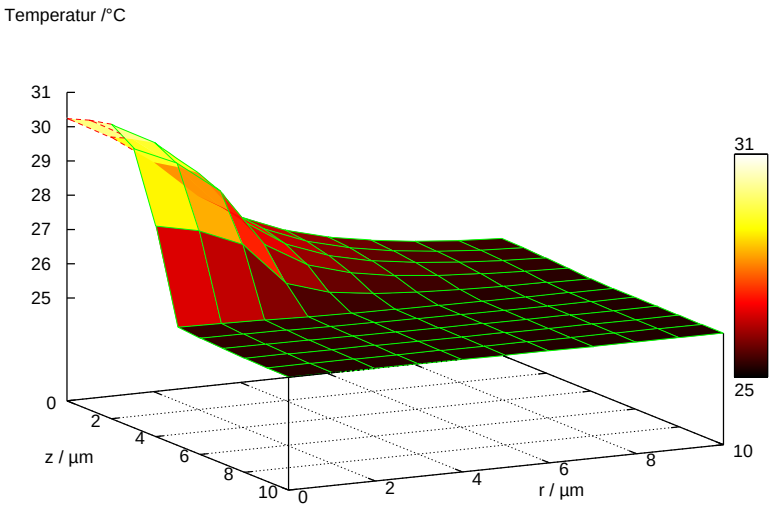


Abb. 3.9.: *Temperaturverteilung nach 2 ms cw-Einstrahlung mit 150 µW „von unten“ bei Verwendung von Saphir*

In Abb. 3.8 sind zum Vergleich die Saphir-Ergebnisse von Abb. 3.3 mit eingezeichnet. Durch die effektive Wärmesenke nahe am Ort der höchsten Absorption wird die Wärme besonders gut abgeführt. Dies führt zu einer insgesamt niedrigeren Temperatur bei gleicher Einstrahlleistung. Daraus lässt sich jedoch kein Vorteil ziehen, da zur Erreichung einer bestimmten Temperatur eine entsprechend höhere Laserleistung verwendet werden muss. Die bereits erwähnte relative Temperaturerhöhung liegt deutlich ungünstiger (9,7% statt 5,4%). Das heißt, eine Bestrahlung durch den Träger hindurch ist eher nachteilig.

Wärmeverteilung nach Ablation: Bei den bisherigen Betrachtungen wurden Ablationsprozesse nicht berücksichtigt. Durch Ablation von Teilen des Zellmaterials wird ein großer Anteil der eingebrachten Wärme mit dem Material abtransportiert und spielt dann für die weitere Wärmeausbreitung keine Rolle mehr.

Um eine erste Vorstellung zu bekommen, in welcher Weise die Simulationsergebnisse hierfür korrigiert werden müssen, wird das Modell gemäß Abb. 3.2 gewählt. Die sonstigen Parameter werden wie in Abb. 3.6 für BK7 als Träger gewählt, d.h. der Pulsmodus ist 10 mW - 100 µs. Allerdings wird angenommen, dass die innerhalb des Ablationsbereichs auftreffende Laserstrahlung keinen Wärmebeitrag für die Umgebung liefert. Die gesamte eingebrachte Energie ist also entsprechend geringer. Die Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen die Ergebnisse.

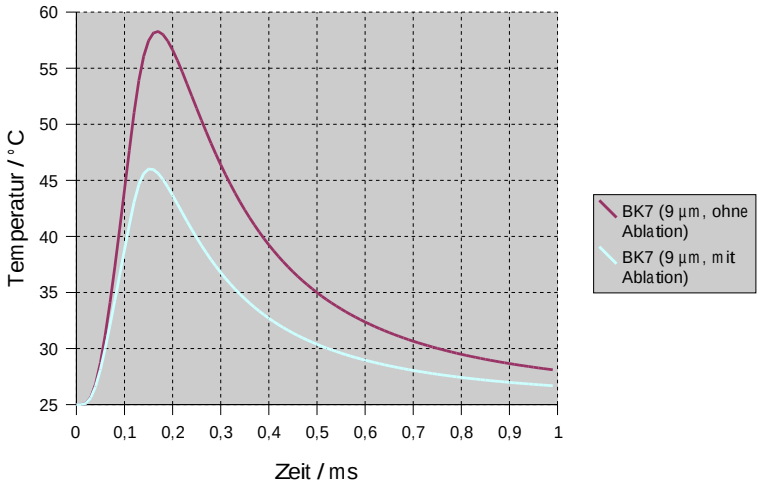


Abb. 3.10.: *Zeitliche Temperaturverläufe bei einer gepulsten Einstrahlung mit und ohne Berücksichtigung von Ablationsprozessen*

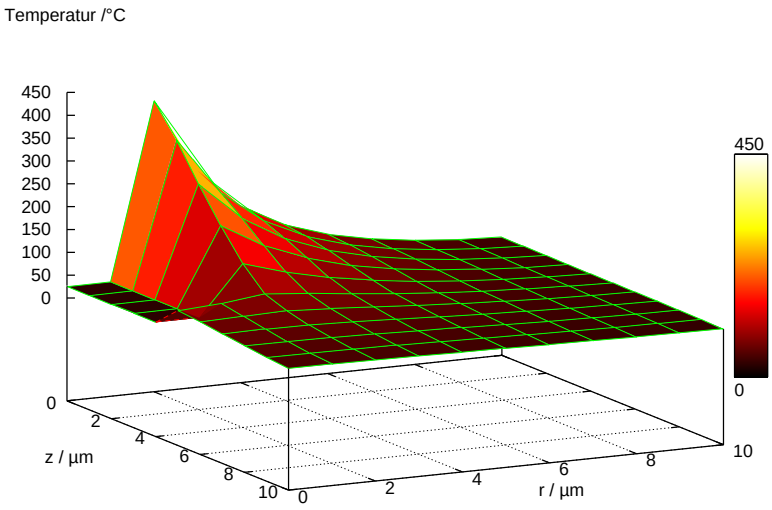


Abb. 3.11.: *Temperaturverlauf direkt nach einer gepulsten Einstrahlung mit 10 mW - 100 µs unter Berücksichtigung der Ablation mit BK7 als Träger*

In Abb. 3.10 sind zum Vergleich die entsprechenden Daten aus der Rechnung ohne Ablation mit eingetragen. Erwartungsgemäß kommt es bei Berücksichtigung der Ablation in 9 µm Entfernung vom Zentrum zu deutlich niedrigeren Temperaturen. Das heißt, beim Schneiden von biologischen Strukturen wird durch den Ablationsprozess die thermische Belastung der umgebenden Zellen vermindert. Die Abb. 3.11 zeigt die Temperaturverteilung direkt nach dem Puls. Die maximale Temperatur wird mit ca. 412°C direkt am ablatierten Rand erreicht. Bis auf die Tatsache, dass ein bereits ablatierter Bereich angenommen wurde, bleibt die Verdampfung von Wasser weiterhin unberücksichtigt. Da in Wirklichkeit eher mit einem Gaußprofil als mit einem Tophat-Profil zu rechnen ist, dürften die Temperaturen in der Realität niedriger liegen.

3.4. Anforderungen an das Lasersystem

3.4.1. Wellenlänge

Wie bereits in Kap. 1 diskutiert, kann die verwendete Wellenlänge von 2,8 µm für das gewählte Modell als nahezu optimal betrachtet werden, da über 90% der eingebrachten Energie in den ersten 5 µm (angenommene Dicke der Zellschicht) absorbiert werden. Im Trägermaterial findet kaum eine Absorption statt. Darin unterscheidet sich das angestrebte Lasersystem wesentlich

von in der Literatur beschriebenen Systemen zur Bestrahlungen von Zell-Monolayern mit einem Nd:YAG-Laser [8].

3.4.2. Zu verwendende Leistungen und Energien

In den Simulationen waren sowohl gepulste als auch kontinuierliche Lasermodi nachgebildet worden. Bei Vergleich der Ergebnisse in den Abbildungen 3.5 bis 3.7 scheint für ablative Zwecke eine Pulsdauer von 100 µs, die auch in Abb. 3.10 verwendet wurde, sinnvoll zu sein. Dafür müsste der Laser am Ort der Probe Spitzenleistungen von 10 mW zur Verfügung stellen. Selbst unter der Bedingung einer Strahlqualität nahe der Beugungsbegrenzung ist dies mit einem diodengepumpten Festkörperlaser kontinuierlich erreichbar, so dass auf eine interne Güteschaltung verzichtet werden kann. Stattdessen könnte ein externer Modulator oder Shutter zum Einsatz kommen.

Ein Pulsbetrieb wurde in dieser Arbeit jedoch nicht verwirklicht, wofür drei Gründe zu nennen sind:

1. Die für ein Shuttern der Laserstrahlung erforderliche Technik erwies sich als zu teuer. In Frage gekommen wären akusto- oder elektrooptische Modulatoren, die jedoch für die gewünschte Wellenlänge von 2,8 µm nicht serienmäßig zu bekommen waren, oder piezogesteuerte, nach dem Prinzip der unterdrückten Totalreflexion arbeitende Prismenpaare.
2. Bei Bedarf können blitzlampengepumpte Er:YAG-Laser für diesen Zweck herangezogen werden.
3. Wie in Kap. 9.2 gezeigt wird, ist ein Schneiden von Zellmaterialien auch im cw-Betrieb möglich.

Die Ergebnisse für den „Stimulationsbetrieb“ zeigen, dass Leistungen weit unterhalb von 1 mW durchaus ausreichen, so dass für einen stabilen Laserbetrieb möglicherweise mit entsprechenden Abschwächern gearbeitet werden sollte.

3.4.3. Fokussierung

In der Simulation wurde zum einen ein Tophat-Profil mit einem Durchmesser von 6 µm verwendet. Zum anderen wurde im Ablationsmodell ein ablatierter Bereich von 4 µm im Durch-

messer angenommen, die Tatsache berücksichtigend, dass nur die „Gauß-Ränder“ der Strahlung, die nicht zur Ablation beitragen, für einen Wärmeeintrag in die Zellschicht verantwortlich sind.

In der Realität wäre jedenfalls ein Taillendurchmesser von unter 10 µm anzustreben. Das ist bei einer Wellenlänge von 2,8 µm nur möglich, wenn der Laserstrahl beugungsbegrenzt ist und wenn eine Fokussieroptik mit hoher numerischer Apertur ($>$0,28) verwendet wird.

4. Diodengepumpte cw-Laser im mittleren Infrarot

4.1. Theoretischer Hintergrund

Lange Zeit galt ein cw-Betrieb von Erbiumlasern mit Emissionswellenlängen um 3 µm als nicht realisierbar, da in allen untersuchten Wirtskristallen das verwendete obere Laserniveau ($I_{11/2}$) kurzlebiger als das untere ($I_{13/2}$) ist. 1987 gelang jedoch Kintz et al. [15] und Huber et al. [11] erstmalig ein kontinuierlicher Laserbetrieb mit Er:YLF[1] bzw. Er:YSGG[2]. Hierfür sind primär Upconversion-Prozesse verantwortlich, die die effektive Lebensdauer des unteren Niveaus erheblich erniedrigen (Abb. 4.1). Hierbei überträgt ein in den Grundzustand zurückfallendes Elektron seine Energie strahlungslos an ein entsprechendes Elektron eines Nachbarions, das in ein höheres Niveau ($I_{9/2}$) gehoben wird und dann in das obere Laserniveau relaxiert. Die Effektivität dieses Prozesses wird im Wesentlichen von drei Faktoren bestimmt:

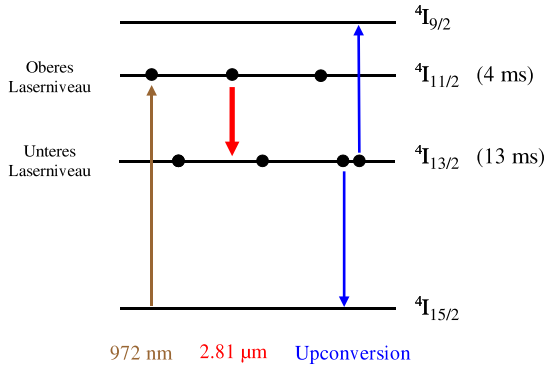


Abb. 4.1.: *Energieniveauschema von Er:YLF und die wichtigsten Übergänge (aus[13])*

- Mit zunehmender Pumpleistungsdichte erhöht sich die Besetzungsdichte auf beiden Laserniveaus, damit auch die Wahrscheinlichkeit des oben beschriebenen Energietransfers.

[1] $Er:LiYF_4$
[2] $Er:Y_3Sc_2Ga_3O_{12}$

- Aus dem gleichen Grund fördert auch eine hohe Dotierung die Upconversion-Prozesse.
- Die Energieübertragung kann nur dann erfolgen, wenn der Energieerhaltungssatz dabei erfüllt bleibt. Hierfür ist notwendig, dass die beteiligten Niveaus möglichst äquidistant sind. Inwieweit dies gegeben ist, hängt sehr vom verwendeten Wirtsmaterial ab.

4.2. Stand der Technik

Durch die rasante Entwicklung der Hochleistungsdioden wurden in den letzten Jahren mit zunehmenden Pumpleistungsdichten auch neue Leistungsrekorde bei Erbium-cw-Lasern erzielt. So beschreibt T. Jensen in seiner Dissertation an der Universität Hamburg [13] einen diodengepumpten Er:YLF-Aufbau mit Leistungen bis 1,1 W. Chen et al. erreichten 1,15 W mit einem Er:YAG[3]-Laser, gepumpt mit speziellen „High Brightness“- Dioden [2]. Zunehmende Bedeutung erlangen in letzter Zeit auch Erbium-Faserlaser [29]. Aufgrund der hohen Preise der verwendeten Pumpdioden ist jedoch bislang kein kommerzielles Erbium-cw-System auf dem Markt. Ein weiteres Problem ist, dass mit den hohen Pumpleistungsdichten die Gefahr von Kristallbrüchen steigt.

4.2.1. Pumpanordnungen

Der Forderung nach einer hohen Pumpleistungsdichte lässt sich prinzipiell auf drei verschiedene Weisen nachkommen:

Endpumpen: Die Pumpstrahlung wird in das meist stabförmige laseraktive Medium durch eine Endfläche hindurch fokussiert (Abb. 4.2). Die erreichbare Dichte der Pumpleistung hängt von Leistung und Strahlqualität der verwendeten Laserdiode ab. Häufig werden diese Dioden fasergekoppelt angeboten, wobei bei höheren Leistungsstufen mehrere Einzelfasern zu einem Bündel zusammengefasst werden. Um verschiedene fasergekoppelte Laserdioden miteinander vergleichen zu können, kann eine Kenngröße K eingeführt werden:

$$K = \frac{P}{(D_k \cdot NA)^2} \tag{4.1}$$

Hierbei ist P die Ausgangsleistung, D_k der Faserkerndurchmesser und NA die numerische Apertur der Faser. Je größer K ist, desto größere Pumpleistungsdichten lassen sich erzielen.

[3] Er:$Y_3Al_5O_{12}$

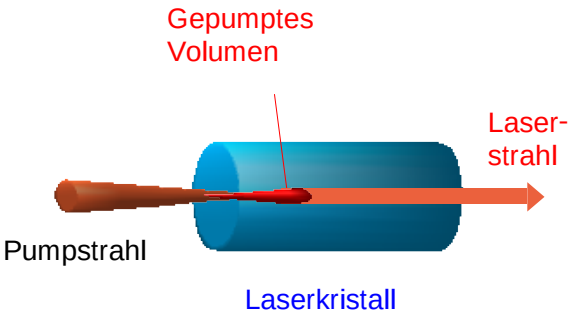


Abb. 4.2.: *Endgepumpter Laserkristall*

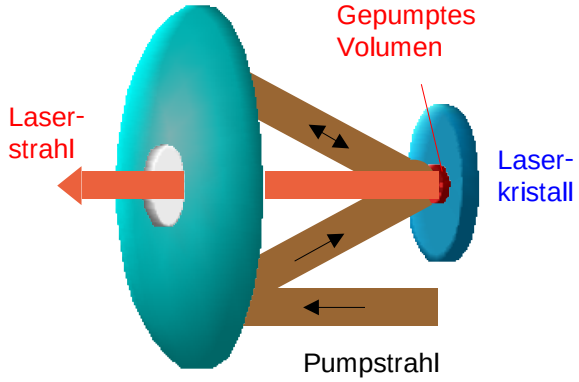


Abb. 4.3.: *Scheibenlaser-Prinzip*

Neben K spielen jedoch auch noch andere Spezifikationen eine wesentliche Rolle, besonders das Emissionsspektrum der Laserdiode. Je genauer es mit dem Absorptionsspektrum des gepumpten Kristalls übereinstimmt, desto geringer ist die Eindringtiefe und desto größer die pro Volumeneinheit absorbierte Leistung.

Scheibenlaser-Prinzip: Bei diesem Prinzip ist das laseraktive Material in Form einer dünnen Scheibe ausgebildet, die auf einen Kühlfinger aufgebracht ist (Abb.4.3) [6]. Die dem Kühlfinger zugewandte Seite der Scheibe ist für die Laserwellenlänge aber auch für die schräg einfallende Pumpstrahlung hochreflektierend verspiegelt. Die hohe Pumpleistungsdichte wird nun erzeugt, indem der Pumpstrahl durch einen Parabolspiegel und weitere Optiken so gelenkt wird, dass er öfters (z.B. 16 mal) die Scheibe an der selben Stelle durchläuft. Das Besondere an dieser Anordnung ist die Tatsache, dass an die Strahlqualität der Laserdiode keine besondere Anforderung gestellt werden muss, was die Kosten entsprechend niedrig hält.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Strahlwerkzeuge (IFSW) an der Universität Stuttgart mehrere Experimente durchgeführt. Das Ziel war, zu überprüfen, in wieweit das Scheibenlaserprinzip bei Erbium-dotierten Materialien verwendet werden kann. Als vorläufiges Ergebnis kann festgehalten werden, dass mit Er:YLF zwar ein Laserbetrieb möglich ist, jedoch mit sehr geringem Wirkungsgrad und für Scheibenlaser ungewöhnlichen thermischen Effekten. Ein Grund dafür ist die geringe Länge der Verstärkungszone. Als problematisch erwies sich auch die komplizierte Beschichtung der Scheiben, die neben ihren optischen Funktionen auch eine optimale Wärmeableitung ermöglichen soll.

Faserlaser-Prinzip: Eine weitere Möglichkeit, eine hohe Pumpleistungsdichte zu erzeugen, ist das Prinzip des Faserlasers. Ein nur einige Mikrometer dicker dotierter Faserkern ist von undotiertem Material umgeben, das von der Faserendfläche her gepumpt wird. Es zeigt sich, dass auch bei Faserlasern High-Brightness-Dioden verwendet werden müssen. Da für die gewünschte Wellenlänge die aufwendige Herstellung erbiumdotierter Fasern mit hohen Kosten verbunden ist, wurde das Faserlaser-Prinzip in dieser Arbeit nicht verwendet.

4.2.2. Laserkristalle

In den Untersuchungen der letzten Jahre hat sich Er:YLF (Emissionswellenlänge ca. 2,8 µm) als ein sehr brauchbares Material herausgestellt, wobei heute meist eine Erbiumdotierung von 15% verwendet wird. Im Vergleich zu YSGG bildet YLF eine wesentlich geringere thermische Linse aus, macht jedoch oft bei Beschichtungen Schwierigkeiten, da diese üblicherweise auf oxidischer Basis beruhen und auf Fluoriden schlecht haften. Ein Vorteil von Er:YLF gegenüber Er:YSGG ist, dass die Pumpwellenlänge mit 972 nm (Er:YSGG: 965 nm) näher an 980 nm liegt, die eine gängige Diodenwellenlänge ist. Gelegentlich kann so eine 980 nm-Laserdiode, die außerhalb der Spezifikation liegt, bei einer entsprechenden Kühlung für das Pumpen von Er:YLF verwendet werden.

In einer Kooperation mit dem Vavilov State Optical Institute (GOI) in St. Petersburg wurde nach alternativen Kristallmaterialien gesucht, die einen cw-Betrieb bei Wellenlängen um 3 µm ermöglichen. Wie oben erläutert wäre ein Material besonders attraktiv, das bei einer Wellenlänge von 980 nm statt 972 nm gepumpt werden kann. Die Kooperation ist noch nicht abgeschlossen, d.h. die endgültigen Ergebnisse stehen noch aus. Bislang lässt sich sagen, dass mit Er:BYF[4] ein Material gefunden wurde, das vom Wirkungsgrad dem Er:YLF überlegen zu sein scheint, jedoch auch bei etwa 972 nm gepumpt werden muss. Die genauen Messergebnisse finden sich im Anhang (A.4).

[4] Er:BaY_2F_8

5. Auslegung des Laserresonators

Um eine Fokussierbarkeit der Strahlung auf Durchmesser von nur wenigen Mikrometer zu erreichen, muss das Resonatordesign so gewählt sein, dass der emittierte Laserstrahl nahezu beugungsbegrenzt ist (Gauß-Strahl, d.h. TEM_{00} bzw. $M^2 \approx 1$[1]).

5.1. Rechenmethode

Zur Simulation und Festlegung des Resonatordesigns wurde das Resonator-Simulationsprogramm *Megauss* (erstmalig in [3] angewendet) zur Version 2.0 weiterentwickelt. Es erlaubt die Modellierung endgepumpter Laserresonatoren unter Einbeziehung thermischer Linseneffekte [12]. Daneben ermöglicht es eine Abschätzung zur Justierbarkeit und damit Realisierbarkeit von Laserresonatoren. Intern arbeitet das Programm mit einem Matrix-Formalismus für Gaußstrahlen, wobei es gelungen ist, auch die thermischen Linseneffekte und Justierbarkeitskriterien mit diesem Formalismus zu beschreiben. Eine Kurzbeschreibung des Programms und eine Bildschirmansicht befinden sich im Anhang (A.1).

5.2. Resonatordesign

5.2.1. Laserkristall

Bei der Wahl des Laserkristalls wurde auf Erfahrungen aus der Literatur [13] und eigenen Experimenten zurückgegriffen. Dabei erweist sich Er:YLF mit einer Erbium-Dotierung von

[1] Nähere Erläuterungen zu M^2: siehe Kap. 5.3

15% als ein inzwischen leicht erhältliches und preiswertes Material mit Eignung für den cw-Betrieb. Für die Experimente wurden zylindrische Kristalle mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Länge von 5 mm verwendet. Zur Berechnung der thermischen Linse müssen einige materialspezifische Daten des Laserkristalls zur Verfügung stehen, wie sie für Er:YLF in Tab. 5.1 aufgeführt werden [13].

Tabelle 5.1.: *Materialdaten zu Er:YLF*

Brechzahl n	dn/dT [K^{-1}]	Therm. Ausdehnungs-koeffizient [K^{-1}]	Wärmeleitf. [W/K·m]	Abs.koeffizient bei 972 nm [cm^{-1}]
1,46	-4,3·10^{-6}	8·10^{-6}	6	5

5.2.2. Pumpfokus

Die Pumpquelle selbst gehört zwar nicht zum eigentlichen Resonator, die Kaustik der Pumpstrahlung im Laserkristall, im Folgenden Pumpfokus genannt, übt jedoch einen entscheidenden Einfluss aus. Daten zur Pumpquelle werden in zweifacher Weise ausgewertet. Zum einen gehen sie wie die Materialdaten des Laserkristalls in die Berechnung der thermischen Linse ein, zum anderen bestimmt der Pumpfokus direkt die Strahlqualität. Als Pumpquelle dient die in Kap. 6.1 genauer beschriebene Laserdiode der Firma AOC (Applied Optronics Corp., USA, Vertrieb durch Laser 2000, Weßling). Für den Pumpfokus-Durchmesser wurde angenommen, dass die Endfläche der Laserdioden-Faser mit einem Kerndurchmesser von 324 µm im Abbildungsmaßstab 1:1 fehlerfrei in den Laserkristall abgebildet wird. Die numerische Apertur beträgt 0,12 (bezüglich Luft), die Pumpleistung bis zu 5 W.

5.2.3. Laserspiegel

Die Wahl der Krümmungsradien für die Laserspiegel ist neben den üblichen Kriterien für stabile Resonatoren [17] durch zwei Effekte festgelegt, die im Folgenden näher beschrieben sind.

Wandern der Strahltaille: Die Fokussierung auf die biologische Probe ist gleichbedeutend mit einer stark verkleinernden Abbildung der Strahltaille, die in der Regel innerhalb des Resonators liegt. Der Ort dieser Strahltaille kann jedoch aufgrund der thermischen Linse je nach Pumpleistung um mehrere Millimeter variieren.

Als Beispiel hierfür wird eine Resonatorgeometrie untersucht, bei der der Endspiegel plan und der Auskoppler konkav ist. Diese Geometrie ist in der Abb. 5.1 dargestellt. Die Verschiebung der Taille beträgt bei der maximalen Pumpleistung von 5 W gegenüber einer Pumpleistung von 1 W ca. 2,57 mm. In beiden Fällen liegt die Taille übrigens innerhalb des Laserkristalls. Bei einer 25-fachen Verkleinerung der Taille durch die verwendete Fokussieroptik bedeutet das eine Verschiebung des Fokus entlang der optischen Achse um etwa 100 µm, was nicht akzeptabel ist.

Die einzige Möglichkeit, dies zuverlässig zu unterbinden, ist die Wahl eines planen Auskopplers (Abb. 5.2). Dieser zwingt die Strahltaille auf den Ort der planen Spiegelfläche, unabhängig von der Stärke der thermischen Linse. Ein weiterer Vorteil dieser Anordnung ist, dass zwischen dem resonatorinternen Strahlverlauf am Ort des Laserkristalls und der Pumpstrahlung ein besserer Überlapp zu erzielen ist, wodurch auch die Strahlqualität von $M^2 = 1$ leichter erreicht wird.

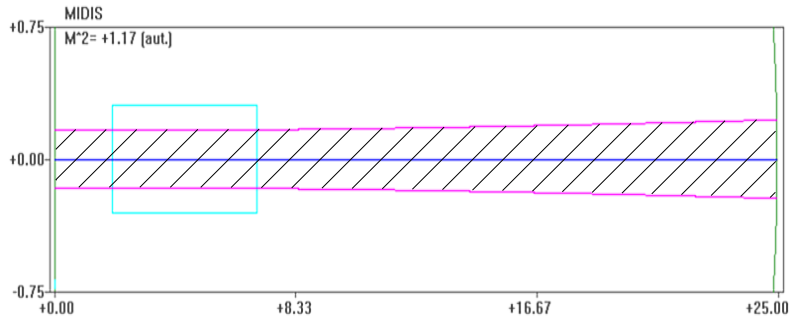


Abb. 5.1.: *TEM_{00}-Mode bei einem konkaven Auskoppler. Ausschnitt aus der leicht nachbearbeiteten Computergrafik. Die nicht dargestellte Pumpstrahlung wird von links in den als Rechteck (nicht maßstabsgetreu) angedeuteten Laserkristall eingekoppelt. Der Verlauf des TEM_{00}-Mode ist schraffiert dargestellt. Der Endspiegel befindet sich am linken, der Auskoppler am rechten Rand.*

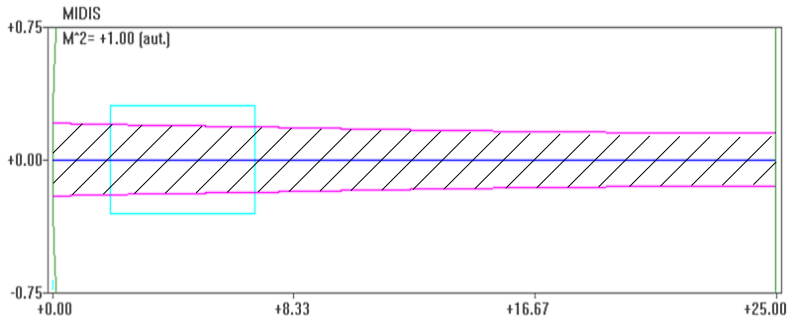


Abb. 5.2.: *TEM_{00}-Mode bei einem planen Auskoppler*

Justierbarkeit: Es bestehen noch Freiheiten bzgl. der Wahl des Endspiegels. Dessen Krümmung hat direkte Auswirkungen auf die Justierbarkeit des Resonators. Um dies zu untersuchen, wird in der Simulation der plane Auskoppelspiegel um 0,1° gekippt und untersucht, wie weit dadurch der Laserstrahl am Laserkristall von der optischen Achse abweicht. Solche Abweichungen lassen den Überlapp zwischen Laserstrahl und Pumpstrahl kleiner werden, wodurch die Ausgangsleistung absinkt [18]. Dies stellt ein Justierbarkeitskriterium dar, da bei der Justage solche Verkippungen vorgenommen werden. In den Abbildungen 5.3 und 5.4 ist dies an zwei Beispielen dargestellt.

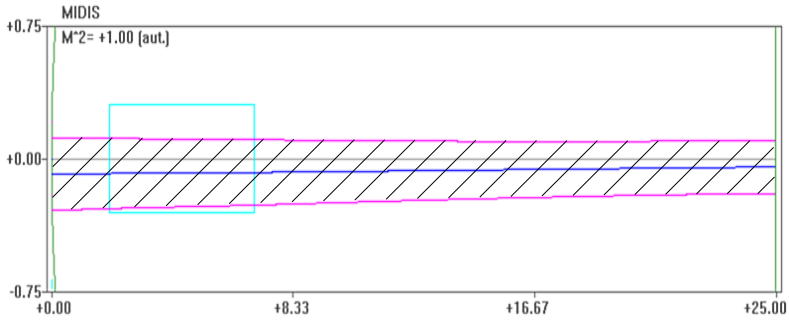


Abb. 5.3.: *Endspiegel mit Krümmung 50 mm*

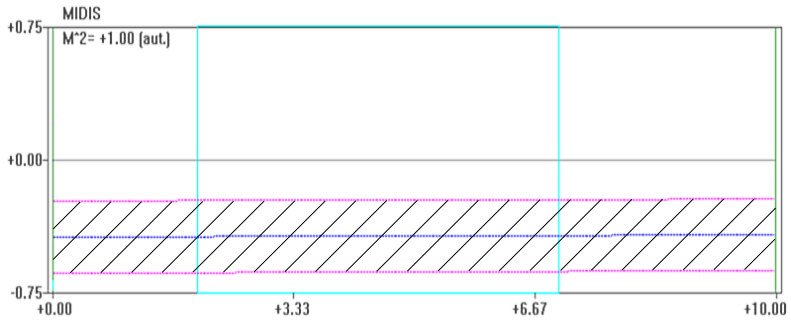


Abb. 5.4.: *Endspiegel mit Krümmung 250 mm*

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde die Resonatorlänge jeweils so gewählt, dass der Laserstrahl am Endspiegel denselben Strahlradius von 205 µm aufweist. Abb. 5.5 zeigt den Zusammenhang für diese und weitere Krümmungsradien. Es zeigt sich, dass die Abweichungen umso geringer werden, je kleiner der Krümmungsradius gewählt wird.

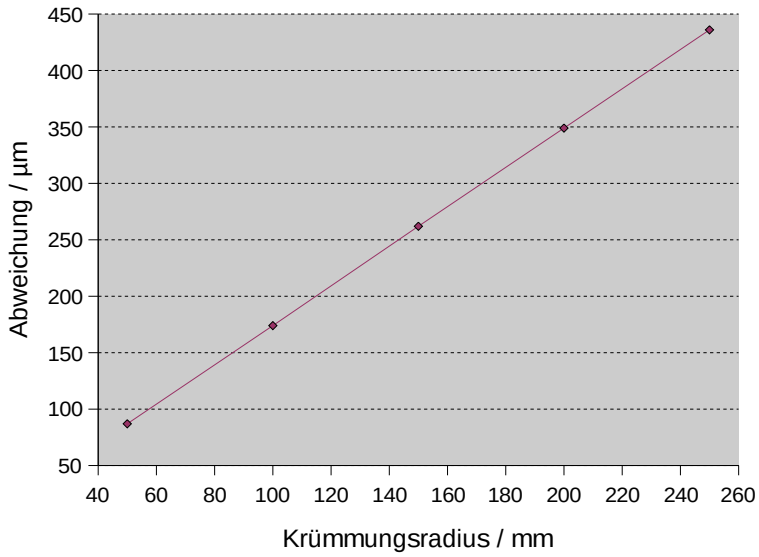
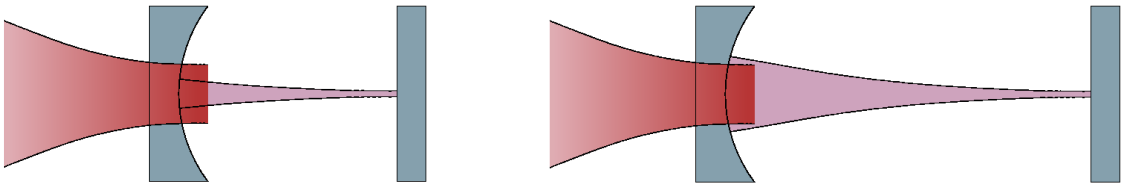


Abb. 5.5.: *Ablage des Laserstrahls von der optischen Achse in Abhängigkeit vom Krümmungsradius des Endspiegels bei Verkippung des Auskopplers um 0,1°*

In der Praxis wurde also der kleinste verfügbare Krümmungsradius (50 mm) für den Endspiegel gewählt. Da dieser Radius gerade der doppelten Länge des plan-konkaven Resonators entspricht, handelt es sich um eine sog. semi-konfokale Anordnung.

5.2.4. Resonatorlänge

Die für einen TEM_{00}-Betrieb notwendige Resonatorlänge kann bei endgepumpten Systemen nicht pauschal angegeben werden. Sie ist von der verwendeten Laserdiode und der sich anschließenden Pumpoptik abhängig. Mit zunehmender Resonatorlänge vergrößert sich die aktive Modenfläche des Grundmodes (Abb. 5.6).



(a) Eine zu kurze Resonatorlänge lässt die Pumpstrahlung über den dargestellten Grundmode hinausragen. Im Ergebnis schwingen höhere transversale Moden an.

(b) Die Resonatorlänge ist so gewählt, dass nur noch der Grundmode von der Pumpstrahlung angeregt werden kann.

Abb. 5.6.: *Einfluss der Resonatorlänge auf die Anzahl der anschwingenden Transversalmoden bei einem endgepumpten System. In der vereinfachten Skizze ist das laseraktive Material nicht dargestellt. In der Praxis befindet es sich direkt am linken Resonatorspiegel.*

Ab einer bestimmten Resonatorlänge wird nur noch der Grundmode von der Pumpstrahlung angeregt. Eine weitere Vergrößerung der Resonatorlänge bringt dann keine weiteren Vorteile, sondern verschlechtert die Justierbarkeit bzw. lässt den Resonator instabil werden.

In diesem Sinne wurden Simulationen durchgeführt, wobei mit den oben ermittelten Krümmungsradien für die Spiegel und einer Laserkristall-Länge von 3 mm gerechnet wurde. Der Laserkristall befinde sich in einem Abstand von 2 mm vom Endspiegel. In diesem Fall wird bereits bei einer Resonatorlänge von 25 mm nur noch der Grundmode angeregt, da der Lasermode am Ort des aktiven Mediums bereits einen Durchmesser von etwa 400 µm hat. Der genaue Wert ändert sich aufgrund der thermischen Linse mit der Pumpleistung, liegt aber im gesamten Dynamikbereich der Laserdiode deutlich über dem Pumpfokus-Durchmesser von 324 µm.

5.2.5. Designfestlegung

Das nach obigen Überlegungen ermittelte Resonatordesign soll an dieser Stelle noch einmal zusammengefasst werden.

Der erste Resonatorspiegel ist konkav, mit einem Krümmungsradius von 50 mm, der zweite Spiegel plan. Der Abstand der Spiegel beträgt 25 mm. Der Laserkristall befindet sich nahe am ersten Spiegel und hat eine Länge von 3 mm.

5.3. Erwartete Strahlparameter

Durch die Festlegung des Resonators können nun Aussagen zum erwarteten Verlauf des Laserstrahls nach dem Auskoppler gemacht werden. Die Strahltaille des Gaußstrahls, die sich am Ort des planen Auskopplers befindet, hat nach den Berechnungen einen Strahlradius w_0 zwischen 0,134 mm und 0,149 mm, je nach Pumpleistung und damit thermischer Linse. Der weitere Strahlverlauf kann nun folgendermaßen charakterisiert werden: Der Strahlradius $w(z)$ in einer Entfernung z von der Taille beträgt [28]:

$$w(z) \;=\; \sqrt{{w_0}^2 + \frac{z^2\lambda^2}{\pi^2 {w_0}^2}} \tag{5.1}$$

Es wird an dieser Stelle nicht berücksichtigt, dass sich mit dem Auskoppelspiegel streng genommen noch eine Optik im Strahlengang außerhalb des Resonators befindet. Für den austretenden Strahl wirkt der Spiegel jedoch lediglich als dünne planparallele Platte, die vernachlässigt werden kann.

Die Fernfelddivergenz berechnet sich aus Gl. (5.1) durch:

$$\Theta \;=\; \lim_{z\to\infty} \frac{w(z)}{z} \;=\; \frac{\lambda}{\pi w_0} \tag{5.2}$$

Wir wollen nun die Beschränkung auf den Grundmode ein Stück weit verlassen und in der Rechnung höhere transversale Moden mit berücksichtigen, wenn auch in einer stark vereinfachenden Form. Dabei geht man näherungsweise davon aus, dass der Strahlradius eines Multimodestrahls um einen Faktor M größer ist als der des zugehörigen Grundmodes. Dieser Ansatz ermöglicht auch weiterhin die Verwendung des erwähnten Matrix-Formalismus und erlaubt es, Beziehungen, die eigentlich für den Grundmode gelten, auf einen Multimodestrahl

anzuwenden. Für die Strahltaille des Multimodestrahls gilt also: $w_{M0} = M \cdot w_0$. Man kann zeigen, dass auch der Fernfelddivergenzwinkel mit einem Faktor M belegt werden muss ([28]):

$$\Theta_M \;=\; M \cdot \Theta \;=\; M \cdot \frac{\lambda}{\pi w_0} \tag{5.3}$$

Für das Strahlparameterprodukt $\Theta_M \cdot w_{M0}$ ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\Theta_M \cdot w_{M0} \;=\; M^2 \cdot \frac{\lambda}{\pi} \tag{5.4}$$

Der Ausdruck M^2 wird oft verwendet, wenn es um Strahlqualität geht (M^2-Messgeräte u.Ä.). $M^2 = 1$ bedeutet hierbei Grundmode. Man kann Gl. (5.3) nun nach M auflösen und quadrieren:

$$M^2 \;=\; \left(\frac{\pi w_0 \Theta_M}{\lambda}\right)^2 \tag{5.5}$$

Dieser Zusammenhang wird in Kap. 6.3.3 noch Verwendung finden. Der Resonator ist so ausgelegt, dass nur der Grundmode anschwingen sollte, also $M^2 = 1$ ist. Wenn dies zutrifft, wird für den Fernfeld-Divergenzwinkel nach Gl. (5.3) ein Wert zwischen 6,0 mrad und 6,7 mrad erwartet, wieder je nach Pumpleistung.

6. Aufbau des Lasersystems

6.1. Experimentalaufbau des Lasers

Ausgehend von den Simulationen zum Laserresonator wurde ein Aufbau gemäß Abb. 6.1 realisiert.

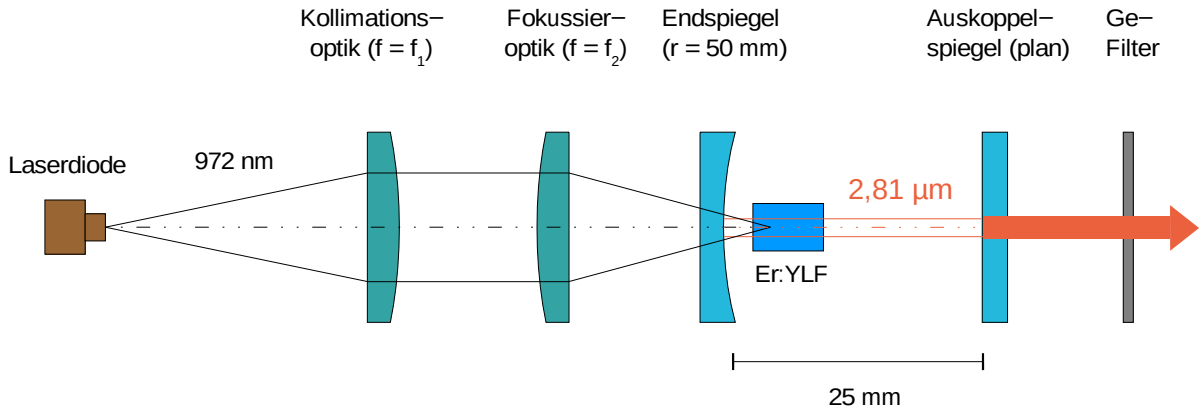
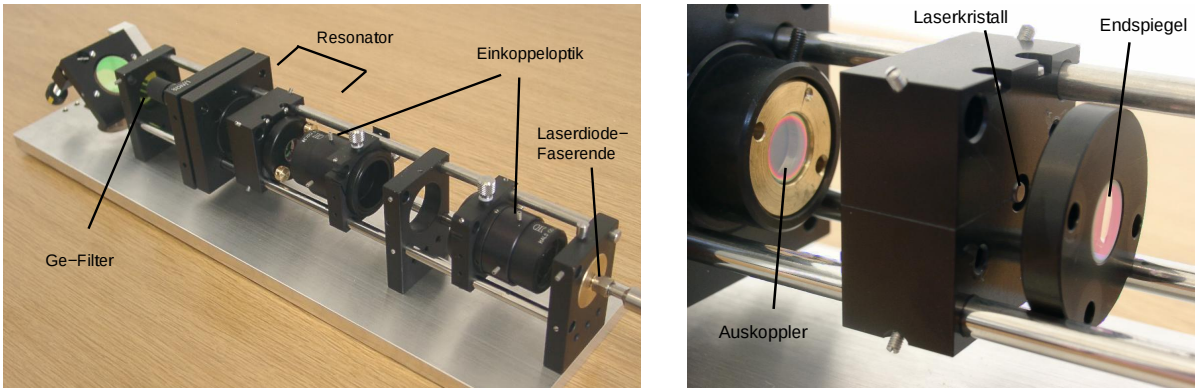


Abb. 6.1.: *Experimentalaufbau des endgepumpten Er:YLF-Lasers*

Die Pumpstrahlung einer fasergekoppelten Hochleistungsdiode mit einer Wellenlänge von 972 nm wird mittels zweier sphärisch korrigierter Tripletts ($f_1 = f_2 = 30$ mm) knapp hinter die Endfläche eines Er:YLF-Kristalls (siehe Kap. 5.2.1) fokussiert. Die genaue Position wird auf eine maximale Ausgangsleistung hin justiert (siehe im Anhang A.5). Um die Gefahr eines Kristallbruchs zu reduzieren, wurde die zur Pumpstrahlung weisende Endfläche des Laserkristalls mit einem Lüfter leicht angeblasen. Der Resonator wurde nach den Vorgaben in Kap. 5.2.5 aufgebaut. Die Resonatorlänge beträgt 25 mm. Zum Abblocken eventueller Reste der Pumpstrahlung befindet sich am Ausgang des Lasers ein Germanium-Filter. Wie

sich später herausstellte, ist es vorteilhaft, den Filter wegzulassen. Näheres hierzu wird in Kap. 7.2.2 erläutert. Die Abb. 6.2 zeigt fotografische Ansichten des entwickelten Lasers.



(a) Gesamtansicht

(b) Detailansicht des Resonators (zur besseren Erkennbarkeit teilweise zerlegt)

Abb. 6.2.: *Aufnahmen des entwickelten Infrarot-Lasers*

Das verwendete Pumplaserdioden-Modul der Firma AOC emittiert bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von etwa 971 nm. Das Modul besteht aus sieben in Reihen geschalteten Einzeldioden mit Ausgangsleistungen von jeweils etwa 800 mW und einer zusätzlichen roten Zielstrahldiode. Die Emissionen jeder Diode werden über Mikrofasern zu einer Gesamtfaser gebündelt, die eine numerische Apertur von 0,12 und einen Kerndurchmesser von 324 µm hat. Am Ausgang der Faser beträgt die Maximalleistung 5 W. Die in Kapitel 4.2.1 eingeführte Kenngröße K beträgt nach Gl. (4.1) etwa 3308 W/mm^2. Laserdioden mit so hohen Werten werden im kommerziellen Bereich als High-Brightness-Dioden bezeichnet.

Die Zentralwellenlänge des Diodenmoduls ist abhängig von der Temperatur und dem Betriebsstrom. Es wurde daher eine Vorrichtung geschaffen, mit der das Modul durch Peltier-Elemente auf einer gewünschten Temperatur gehalten werden kann. Im vorliegenden Fall wurde eine Temperatur von 30°C eingestellt, das entspricht einer Zentralwellenlänge von 971 nm bis 973 nm je nach verwendeter Pumpleistung. Die genauen spektralen Eigenschaften und Temperaturabhängigkeiten des Moduls sowie der mechanische und elektrische Aufbau sind im Anhang beschrieben (A.2 und A.3).

Für eine vollständige Beschreibung des Aufbaus müssen noch die notwendigen Beschichtungen erläutert werden. Erbium-cw-Laser reagieren äußerst sensibel auf resonatorinterne Verlus-

te. Endsprechend hohe Anforderungen müssen an die Beschichtungen der optischen Flächen gestellt werden. Besonders kritisch macht sich in Schichtporen verbleibende Feuchtigkeit bemerkbar. Es ist daher erforderlich, Beschichtungstechnologien wie das ion-sputtering oder das ion-plating zu verwenden, die besonders dichtgepackte Schichtsysteme ermöglichen.

Der Endspiegel wurde für die Laserwellenlänge (2,8 µm) hochreflektierend (HR) und für die Pumpwellenläge (972 nm) antireflex (AR) beschichtet. Der Auskoppler ist für die Laserwellenlänge mit einem Reflexionsgrad von 99% beschichtet. Dieser Wert hat sich bei in der Literatur beschriebenen Experimenten als geeignet erwiesen [13][1]. Auf eine Beschichtung des Laserkristalls, die bei Fluoriden ohnehin schwierig ist, wurde völlig verzichtet. Wenn eine ausreichende Parallelität der Endflächen (<30") gegeben und der Kristall korrekt justiert ist, bleiben die reflektierten Anteile des Lasermodes näherungsweise auf der optischen Achse und gehen daher dem Resonator nicht verloren.

6.2. Fokussierung der Laserstrahlung

Das nahezu beugungsbegrenzte Abstrahlverhalten des Lasers ist eine wichtige Voraussetzung für eine gute Fokussierbarkeit der Strahlung. Nicht minder wichtig ist jedoch die Qualität der verwendeten Fokussieroptik.

Unter Vernachlässigung aller Abbildungsfehler gilt für den $1/e^2$-Fokusdurchmesser d_0 eines Gauß-Strahls [28]:

$$d_0 \approx \frac{2 \cdot f \cdot \lambda}{D} \tag{6.1}$$

Hierbei ist f die Brennweite und D die freie Apertur der verwendeten Fokussieroptik und λ die Laserwellenlänge. Dieser Zusammenhang gilt unter der Voraussetzung, dass durch die freie Apertur D 99% der einfallenden Leistung transmittiert wird. Die Gleichung (6.1) legt nahe, eine Optik mit großer numerischer Apertur ($D/2f$) zu verwenden. Einfache kurzbrennweitige Linsen, selbst wenn es „Linsen bester Form" sind, verursachen zu große Abbildungsfehler, so dass auf komplexere Systeme ausgewichen werden muss. Bei den Abbildungsfehlern verdient der sphärische Fehler besondere Aufmerksamkeit. Chromatische Fehler sollen hier nur am Rande betrachtet werden. Sie kämen nur zum Tragen, wenn neben der monochro-

[1] Bei einem Erbium-cw-Laser ist es sehr schwierig, den optimalen Auskoppelgrad theoretisch zu berechnen, da die hierfür gängigen Formeln aufgrund der Nichtlinearität der Upconversion-Prozesse nicht angewendet werden können.

matischen Infrarot-Laserstrahlung auch noch ein sichtbarer Zielstrahl berücksichtigt werden soll. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Wahl der Fokussieroptik ist die zu erwartende Transmission der Strahlung.

6.2.1. Fokussiermethoden

Eine Fokussieroptik, die die beschriebenen Anforderungen erfüllt, entspricht im Wesentlichen einem Mikroskopobjektiv hoher numerischer Apertur. Hierfür können sowohl brechende (Linsen-) als auch reflektierende (Spiegel-) Optiken verwendet werden.

Diffraktive Optiken: Ein gutes Mikroskopobjektiv besteht meist aus einer großen Anzahl von Linsen und Kittgliedern. Der Entwurf eines solchen Objektivs ist Aufgabe des Optikdesigners, der versucht, die Abbildungsfehler des Gesamtsystems zu minimieren. Es sind vor allem bestimmte Aplanat-Achromat-Kombinationen, die hierfür eingesetzt werden. Ein einfaches Beispiel einer solchen Kombination wird z.B. für die Pumpoptik eingesetzt (Abb. 6.1). Käuflich zu erwerbende linsenbasierte Mikroskopobjektive können jedoch im vorliegenden Fall nicht verwendet werden, da sie nur für Wellenlängen im Sichtbaren geeignet sind, nicht jedoch im mittleren Infrarot. Dieser Wellenlängenbereich setzt besondere Materialien voraus, wie z.B. Saphir oder Infrasil. Eventuell müssten die optischen Flächen antireflex-beschichtet werden, um starke Leistungsverluste zu verhindern. Es wäre zwar möglich, mit diesen Materialien ein Mikroskopobjektiv zu designen und fertigen zu lassen. Die Kosten für eine solche Sonderanfertigung wären jedoch inakzeptabel, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Refraktive Optiken: Als Alternative zu den Linsensystemen können refraktive Optiken verwendet werden. Diese sind bezüglich der geometrischen Optik naturgemäß wellenlängenunabhängig. Das heißt, die chromatische Aberation spielt keine Rolle. Die Firma Coherent (USA) hat eine Reihe von Reflexions-Mikroskopobjektiven im Programm, die weitgehend sphärisch korrigiert sind (Abb. 6.3).

Sie basieren auf dem Cassegrain-Prinzip[2]: Im Falle der Verwendung als Fokussieroptik lenkt ein kleinerer Konvexspiegel die einfallende Strahlung auf einen großen Konkavspiegel, der dann mit einer hohen numerischen Apertur fokussiert. Nachteile dieser Objektive sind zum

[2]Giovanni Cassegrain, 1625-1712, franz. Arzt und Astronom

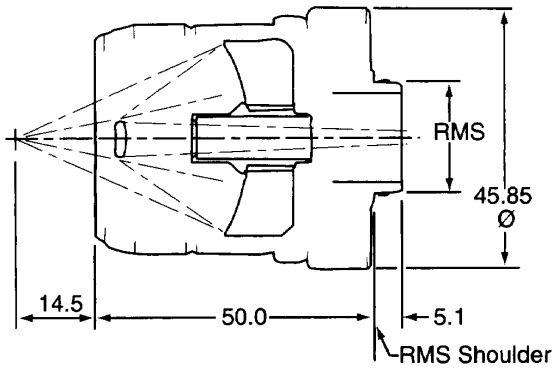


Abb. 6.3.: *Reflexionsobjektiv 25-0514 der Firma Coherent*

einen die unhandliche Baugröße. Zum anderen blendet der kleine Spiegel einen Teil der einfallenden Leistung ab. Diese Abblendung macht sich, wie im Folgenden gezeigt wird, bei einem Gaußstrahl besonders negativ bemerkbar. Es wurden zwei Reflexionsobjektive gekauft und getestet (x25 und x36). Für Versuche, in denen ein besonders kleiner Fokus erwünscht war, wurde das x36-Objektiv verwendet, ansonsten aufgrund des einfacheren Handlings (größerer Arbeitsabstand, größere Tiefenschärfe) das x25-Objektiv.

6.2.2. Verwendete Fokussieranordnung

In der Tabelle 6.1 sind einige Spezifikationen des in Abb. 6.3 dargestellten Reflexionsobjektivs 25-0514 der Firma Coherent aufgelistet.

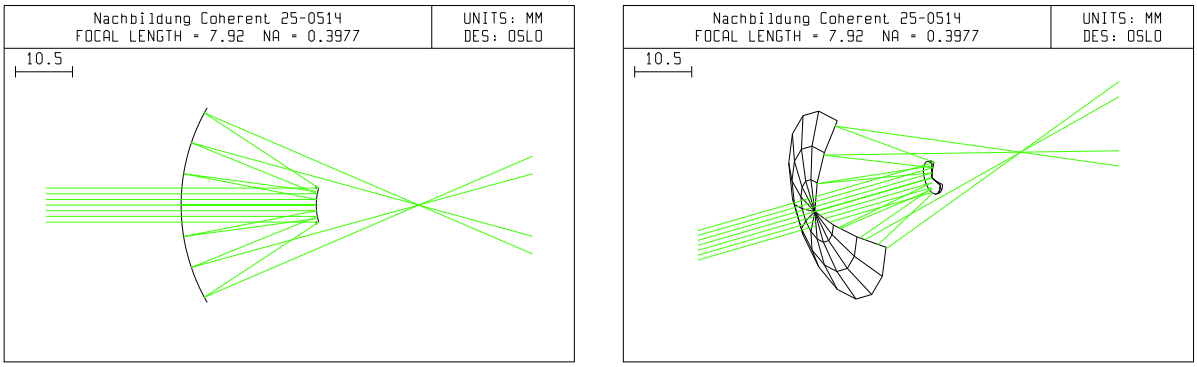
Tabelle 6.1.: *Spezifizierte Parameter des Coherent-Objektivs 25-0514*

	NA	Brennweite	Abblendung	Arbeitsabstand	Durchmesser des kleinen Spiegels
Spezifikation	0,4	8,0 mm	16,7%	14,5 mm	6,3 mm
Nachbildung	0,398	7,92 mm	17,5%	$<$ 18 mm	6,3 mm

Um das Verhalten dieses Objektivs bezüglich eines einfallenden Gaußstrahls näher untersuchen zu können, wurde es mit Hilfe des Optikdesign-Programms OSLO-LT 5.4 nachgebildet.

Leider waren vom Hersteller keine genauen technische Angaben zu bekommen, so dass insbesondere Krümmungsradien abgeschätzt werden mussten. Dennoch ist es gelungen, eine gute Übereinstimmung mit den spezifizierten Parametern zu erzielen. Die Krümmungsradien der Spiegel wurden mit 11 mm und 36 mm, der Abstand der Spiegel mit 25 mm angenommen.

Die nachgebildeten Werte sind zum Vergleich ebenfalls in Tabelle 6.1 eingetragen. 2D- und 3D-Ansichten des nachgebildeten Objektivs zeigt die Abb. 6.4.



(a) 2D-Ansicht ***(b)*** 3D-Ansicht

Abb. 6.4.: *Nachbildung des x25-Reflexionsobjektivs von Coherent*

Anhand dieser Nachbildung können nun einige grundlegenden Eigenschaften untersucht werden.

Abbildungsqualität: Obwohl bei der Nachbildung des Objektivs kein besonderes Augenmerk auf die Abbildungsqualität gelegt wurde, zeigt das Spotdiagramm in Abb. 6.5, dass der geometrische Fehler nahe an der Beugungsgrenze liegt, deren zugehöriges Airy[3]-Scheibchen mit einem schwarzen Kreis dargestellt ist. Man kann daher davon ausgehen, dass das Originalobjektiv eine mindestens ähnlich gute Abbildungsqualität aufweist.

[3]George B. Airy, 1801-1892, engl. Astronom

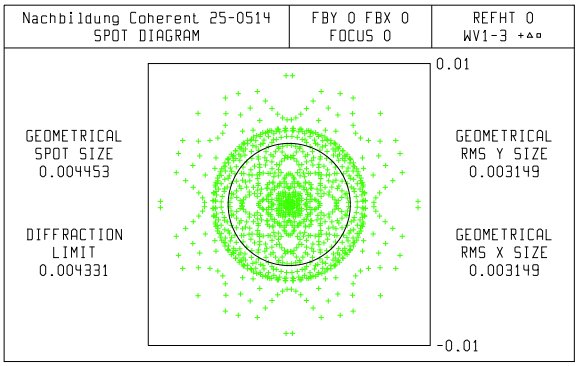


Abb. 6.5.: *Spotdiagramm im Fokus (Abbildungen eines unendlich entfernten Punktes bei Durchrechnung vieler verschiedener Strahlen)*

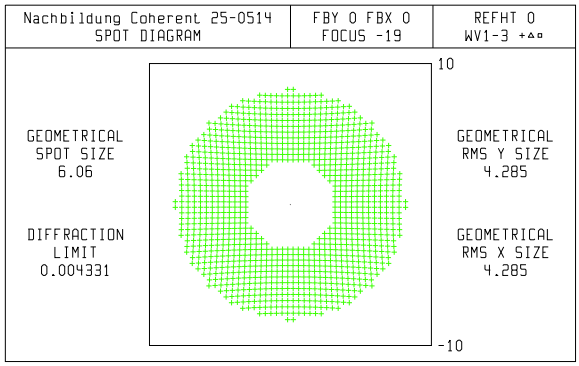


Abb. 6.6.: *Spotdiagramm direkt hinter dem kleinen Spiegel*

Erreichbare Fokusdurchmesser: Um Gl. (6.1) bei diesem Objektiv verwenden zu können, muss beachtet werden, dass für D der Durchmesser des kleinen Spiegels anzusetzen ist. Bei einer Wellenlänge von 2,8 µm ergibt sich dann:

$$d_0 \approx 2 \cdot 8\,\mathrm{mm} \cdot 2,8\,\mu\mathrm{m} \,/\, 6,3\,\mathrm{mm} \;=\; 7,1\,\mu\mathrm{m}$$

Das ist der theoretisch kleinste mit diesem Objektiv erreichbare Fokusdurchmesser. Für das x36-Objektiv ergibt sich analog ein Wert von 5,4 µm.

Transmission: Abb. 6.6 zeigt die Lichtverteilung direkt hinter dem kleinen Spiegel. Die erkennbare Blendenwirkung des kleinen Spiegels hat seine Ursache darin, dass Strahlen bis zu einem Abstand R_1 von der optischen Achse so reflektiert werden, dass sie das Objektiv wieder durch die Eintrittsöffnung verlassen[4] (Abb. 6.7).

Strahlen wiederum, deren Achsenentfernung größer als der Radius des kleinen Spiegels $R_2 = D/2 = 3,15\,\mathrm{mm}$ ist, werden bereits durch den Rand der Eintrittsöffnung ausgeblendet oder treten unfokussiert durch das Objektiv. Es kann gezeigt werden, dass das Verhältnis von R_1 zu R_2 etwa dem Verhältnis von R_2 zu R_3 entspricht. R_3 ist hierbei der äußere Radius der in Abb. 6.6 dargestellten Lichtverteilung. Er beträgt etwa 7,53 mm. Damit kann R_1 zu 1,32 mm berechnet werden.

[4] Es gibt übrigens auch Strahlen, die nach der Reflexion durch den kleinen Spiegel zwar zum großen Spiegel gelangen, dann aber nicht aus dem Objektiv regulär austreten, sondern erneut auf den kleinen Spiegel treffen. Solche Doppelreflexionen erzeugen einen zweiten, näher liegenden Fokus, der experimentell nachgewiesen werden konnte, für die weiteren Betrachtungen jedoch unberücksichtigt bleiben soll.

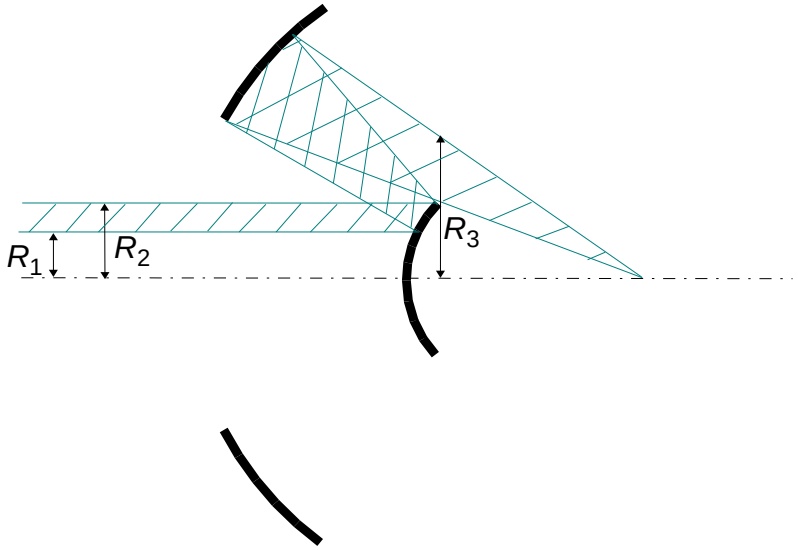


Abb. 6.7.: *Transmission durch das Reflexionsobjektiv. Nur der schraffiert dargestellte Strahlungsanteil innerhalb eines Rings mit dem inneren Radius R_1 und dem äußeren Radius R_2 gelangt durch das Objektiv.*

Die beschriebene Abblendung des Strahls wirkt sich im Leistungsverlust deutlich stärker aus, als die geometrischen Verhältnisse vermuten lassen, da im Falle eines Gaußstrahls die Leistung in der Mitte konzentriert ist. Der bei einem Gaußstrahl vorliegende Leistungsverlust soll im Folgenden berechnet werden.

Die radiale Intensitätsverteilung ist bei einem Gaußprofil gegeben durch:

$$I(r) \;=\; I_0 \cdot \exp\left(\frac{-2r^2}{w^2}\right) \tag{6.2}$$

Hierbei bedeuten r der Abstand zur optischen Achse, w der Strahlradius und I_0 die Maximalintensität. Nur Strahlen mit einem Abstand von der optischen Achse zwischen R_1 und R_2 passieren das Objektiv. Die Transmission berechnet sich also durch:

$$T \;=\; \frac{P(R_2) - P(R_1)}{P(\infty)} \tag{6.3}$$

Die Funktion $P(R)$ beschreibt den Leistungsanteil, der durch eine Blende mit dem Radius R hindurchtritt. $P(\infty)$ ist die Gesamtleistung. Es gilt:

$$P(R) = \int_0^R I(r) \cdot 2\pi r \; dr \tag{6.4}$$

Durch Einsetzen von Gl. (6.2) in Gl. (6.4) und diese dann in Gl. (6.3) erhält man:

$$T = \exp\left(\frac{-2{R_1}^2}{w^2}\right) - \exp\left(\frac{-2{R_2}^2}{w^2}\right) \tag{6.5}$$

$T = T(w)$ wird maximal für

$$w_{max} = \sqrt{\frac{2 \cdot ({R_2}^2 - {R_1}^2)}{\ln {R_2}^2 - \ln {R_1}^2}} \tag{6.6}$$

w_{max} ist der Strahlradius, bei dem die Transmission durch das Objektiv am höchsten ist. In unserem Fall berechnet sich w_{max} zu 3,07 mm und die zugehörige Transmission zu 56,9%. Dieser Wert stimmt mit experimentellen Ergebnissen gut überein. Im Experiment wurden für die Transmission Werte zwischen 50% und 60% festgestellt. Die genauen Messwerte hingen zum einen von der Justage ab. Zum anderen wurde die Divergenz des einfallenden Strahls durch verschiedene vorgeschalteten Optiken variiert. Es zeigt sich sowohl in der Simulation als auch in der Praxis, dass z.B. eine einfache Streulinse vor dem Objektiv die Transmission nicht wesentlich verbessert. Ein erfolgversprechender Ansatz, der jedoch in dieser Arbeit experimentell nicht mehr realisiert wurde, wäre die Verwendung von Axikons, d.h. kegelförmigen optischen Elementen. Mit einem Axikon kann ein ringförmiges Intensitätsprofil des einfallenden Strahl erzeugt werden, das dann durch den kleinen Spiegel keine Abblendung erfährt. Durch geschickte Verwendung zweier Axikons ist es möglich, auch die Strahlqualität des Gaußstrahls weitgehend zu erhalten.

6.3. Eigenschaften des Lasers:

An dem entwickelten Laser einschließlich der verwendeten Fokussierung wurden einige Messungen vorgenommen, um die tatsächliche Emission näher zu charakterisieren.

Als Laserkristall wurde hier Er:BYF mit einer Erbium-Dotierung von 10% verwendet. In allen Experimenten zeigte sich bisher, dass außer einem besseren Wirkungsgrad die Ergebnisse mit Er:BYF denen von Er:YLF vergleichbar sind, also insbesondere in Bezug auf das zeitliche Emissionsverhalten und die Strahlkaustik. Bei den Messungen zum zeitlichen Verhalten wurde außerdem eine andere Pumpdiode verwendet, nämlich die OPC-B015-968-FC der Firma Opto-Power, was jedoch qualitativ keinen Unterschied bedeutet.

6.3.1. Leistung

Die Abbildung 6.8 zeigt die Ausgangsleistung des Lasers in Abhängigkeit von der Pumpleistung. Der differentielle Wirkungsgrad beträgt 7,4%. Die Laserschwelle liegt bei 200 mW. Bedingt durch die begrenzte Pumpleistung wurde eine maximale Ausgangsleistung von 300 mW erzielt.

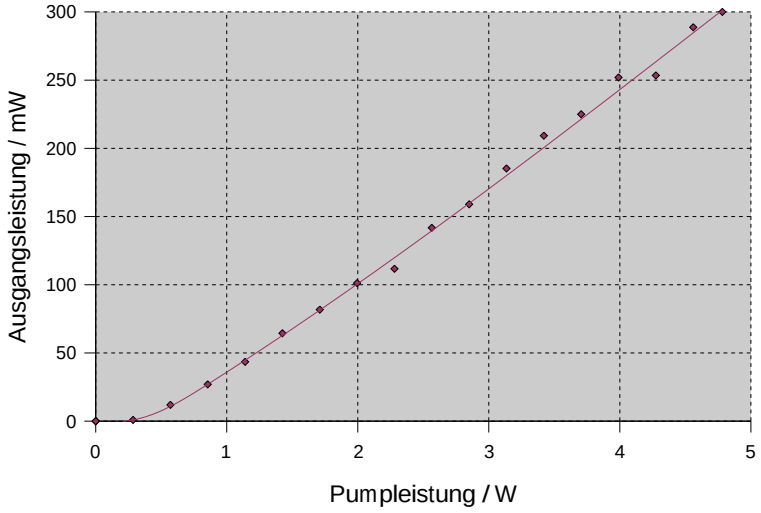


Abb. 6.8.: *Ausgangsleistung des Lasers*

6.3.2. Zeitliches Verhalten

Das zeitliche Emissionsverhalten, das mit einem stickstoff-gekühlten InSb-Messkopf (Typ J10D-M204-R500U-60) der Firma EG & G Judson (USA) gemessen wurde, soll mit zwei Zeitauflösungen betrachtet werden. Den langfristigen Verlauf im Sekundenmaßstab zeigt die Abb. 6.9. Die Messwerte stellen dabei Mittelwerte über jeweils 0,2 s dar. Dies entspricht im Frequenzbild einem Tiefpass.

Die Laserleistung schwankt um bis zu 15%. Tendenziell ist nach etwa 3 s ein Absinken der Leistung zu beobachten. Als Ursache kommen thermische Instabilitäten im Laserkristall in Frage. Schwankungen der Pumpleistung können hingegen ausgeschlossen werden.

Bei höherer Zeitauflösung wird eine Spiking-Struktur sichtbar (Abb. 6.10, in Abb. 6.11 in einem kleineren Zeitregime dargestellt). Die Spikingfrequenz beträgt ca. 70 kHz. Das Spiking

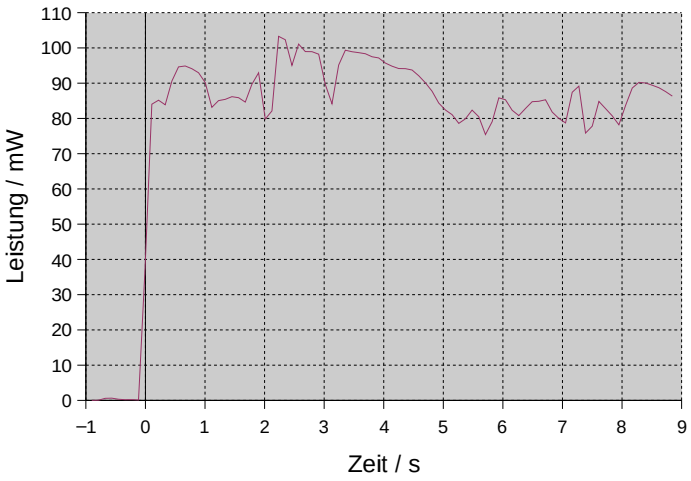


Abb. 6.9.: *Leistungsverlauf in den ersten 9 s nach Einschalten des Lasers*

tritt vor allem in den ersten Sekunden der Laseraktivität auf und wechselt mit ruhigen Phasen ab, verschwindet jedoch nie völlig. Dieses Verhalten von Erbium-dotierten cw-Lasern, das von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wird, ist noch weitgehend unverstanden. Möglicherweise führen die erwähnten thermischen Schwankungen innerhalb des Laserkristalls immer wieder zu Störungen des Besetzungsgleichgewichts. In den thermischen Simulationen kann das Spiking vernachlässigt werden, da dessen typische Zeitkonstanten um Größenordnungen unter denen der thermischen Relaxationsvorgänge liegen.

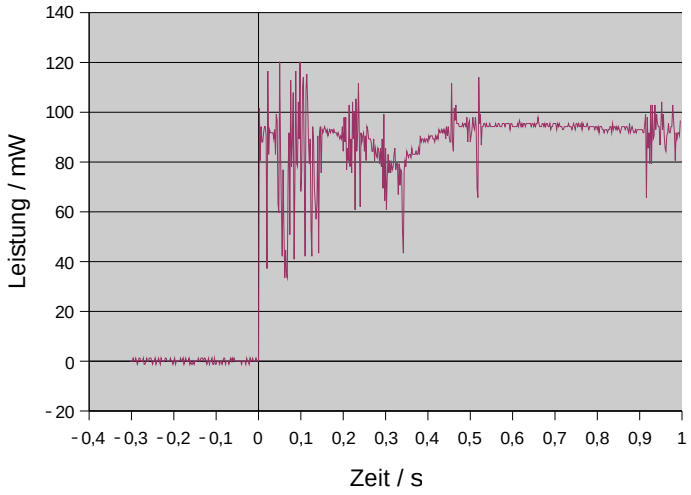


Abb. 6.10.: *Leistungsverlauf mit hoher Zeitauflösung in der ersten Sekunde nach Einschalten des Lasers*

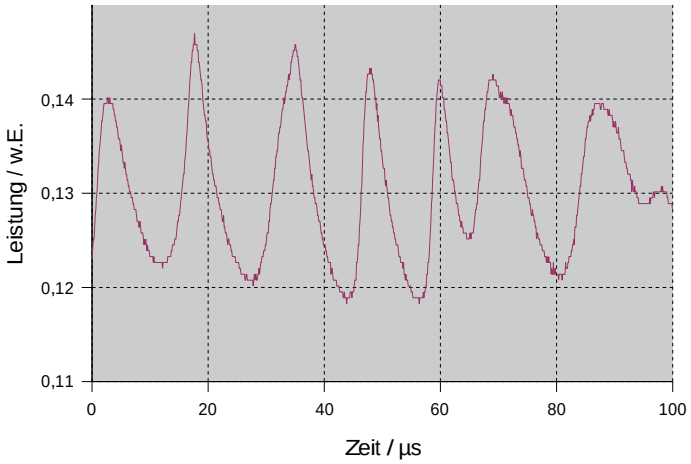
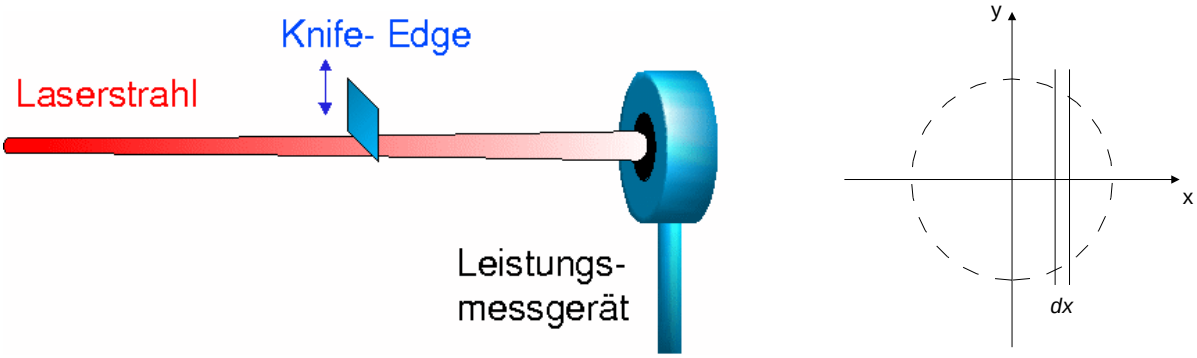


Abb. 6.11.: *Leistungsverlauf im Spiking-Bereich in zeitlich gedehnter Darstellung*

6.3.3. Strahlkaustik

Für die Vermessung des Strahlverlaufs wurden unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Größere Strahldurchmesser (im Millimeterbereich), wie sie nach dem Austritt aus dem Laser vorliegen, wurden mit der Knife-Edge-Methode ausgemessen. Die durch das Reflexionsobjektiv erzielten Fokusdurchmesser (im Mikrometerbereich) einschließlich der Strahlkaustiken in der direkten Umgebung wurden mit Hilfe eines neuartigen Mess-Systems der Firma Dataray Inc. (USA, Vertrieb durch Laser 2000, Stuttgart) gemessen.

Knife-Edge-Methode: Bei der Knife-Edge-Methode wird eine Abblendkante, in diesem Fall eine Rasierklinge, mittels einer Mikrometerschraube durch das Profil bewegt und in Abhängigkeit von dem Kantenort die nicht abgeblendete Leistung gemessen (Abb. 6.12). Diese Art der Messung ist in zweifacher Hinsicht eine integrierende. Betrachten wir hierzu in Abb. 6.12b einen Profilschnitt. Die Kante bewege sich in x-Richtung. In dieser Richtung wird integrierend gemessen, da zunehmend auf- bzw. abgedeckt wird. Differenziert man die Kurve bezüglich x erhält man Verhältnisse wie sie sich bei einem dünnen Spalt der Dicke dx ergeben, der über das Profil bewegt wird.



(a) Anordnung ***(b)*** Integrierende Messung

Abb. 6.12.: *Knife-Edge-Methode*

Die zweite Integration bezieht sich auf die y-Richtung. Bei einem Profil $f(x, y)$ tritt durch den angenommen Spalt an einer Stelle x_0 die Leistung

$$P(x_0) = dx \cdot \int_{-\infty}^{\infty} f(x_0, y)\, dy \tag{6.7}$$

Es stellt sich nun die Frage, in wieweit $P(x_0)$ dem tatsächlichen Profilverlauf, z.B. $f(x_0, 0)$ nahe kommt, insbesondere was Aussagen über den Strahldurchmesser d angeht. Dieser sei durch das $1/e^2$-Kriterium bestimmt. Betrachten wir hierzu zwei Beispiele von rotationssymmetrischen Profilen.

Gaußprofil:

$$f(x, y) = b \cdot e^{-a^2(x^2+y^2)} \tag{6.8}$$

Der Maximalwert des Gaußprofils ist b. Der $1/e^2$-Strahldurchmesser d ergibt sich damit aus

$$f\left(\frac{d}{2}, 0\right) = \frac{b}{e^2} \quad \Rightarrow \quad d = \frac{2\sqrt{2}}{a} \tag{6.9}$$

Der mittels der Knife-Edge-Methode gemessene Verlauf ergibt sich durch Einsetzen von (6.8) in (6.7) zu:

$$P(x_0) = \sqrt{\pi}\, \frac{b}{a}\, dx\, e^{-(ax_0)^2} \tag{6.10}$$

mit dem Maximum $\sqrt{\pi}\,\frac{b}{a}\,dx$ und einem Strahldurchmesser $d' = \frac{2\sqrt{2}}{a} = d$. Dies bedeutet, dass im Falle eines Gaußprofils der durch die Knife-Edge-Methode bestimmte Strahldurchmesser mit dem tatsächlichen übereinstimmt.

Tophat-Profil:

$$f(x,y) = \begin{cases} b & : \quad \sqrt{x^2+y^2} \leq a \\ 0 & : \quad \sqrt{x^2+y^2} > a \end{cases} \tag{6.11}$$

Die weitere Rechnung soll hier nicht weiter ausgeführt werden. Der Strahldurchmesser d ist hier der Tophat-Durchmesser $2a$. Im Ergebnis erhält man:

$$d' = \sqrt{1 - \frac{1}{e^4}} \cdot d \approx 0,99 \cdot d \tag{6.12}$$

Das bedeutet, im Falle des Tophat-Profils beträgt die Abweichung von gemessenem zu tatsächlichem Strahldurchmesser nur ca. 1%.

Insgesamt erweist sich das Knife-Edge-Verfahren also als recht brauchbar, solange es um die Bestimmung von Strahldurchmessern geht und solange ein rotationssymmetrisches Profil vorliegt.

***BeamMap*:** In Kooperation mit der Firma Dataray wurde der Prototyp eines neuartigen Strahlanalyse-Systems (*BeamMap*) getestet. Das Grundprinzip entspricht dem Schlitz, der durch den Strahl bewegt wird. Dies entspricht dem oben beschriebenen Knife-Edge-Verfahren nach der Differentiation, dessen weitere Aussagen hier also analog gelten. Im Gegensatz zu bisherigen Systemen dieser Art, arbeitet hier der Messkopf mit einer Schlitztrommel, die mehrere entlang der optischen Achse versetzte Schlitze enthält. Dadurch wird das Strahlprofil an fünf verschiedenen Stellen gleichzeitig gemessen. Dies erlaubt die Online-Messung eines Fokus im Mikrometerbereich und gleichzeitig die Bestimmung des M^2-Wertes.

Messergebnisse: In zwei verschiedenen Abständen vom Auskoppler wurde das Strahlprofil mit der Knife-Edge-Methode bei einer Pumpleistung von 1,2 W gemessen (Abb. 6.13). Die Pumpleistung ist von Interesse, da sie die thermische Linse und damit auch die Fernfelddivergenz beeinflusst.

Es können die $1/\mathrm{e}^2$-Radien 1,6 mm und 2,18 mm abgelesen werden. Die beiden Messpunkte sind in einem Abstand von 100 mm. Daraus ergibt sich eine Fernfelddivergenz von 5,8 mrad.

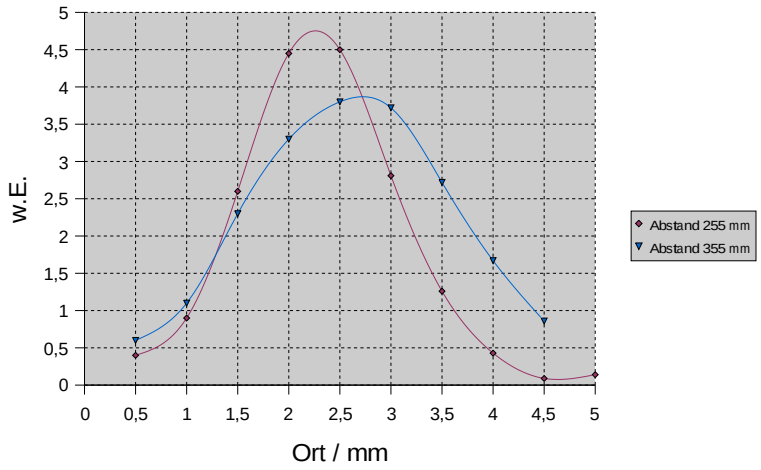


Abb. 6.13.: *Strahlprofil in zwei verschiedenen Abständen vom Auskoppler*

Um eine vollständige Messung der Strahlqualität zu erhalten, müsste der Strahlradius w_0 am Ort des Auskopplers gemessen werden, der für Messungen nicht zugänglich war. Daher wurde für w_0 auf die Rechnung ausgewichen. *Megauss* ermittelt bei einer Pumpleistung von 1,2 W für w_0 einen Wert von 0,145 mm. Mit $\lambda = 2,8$ µm kann dann nach Gl. (5.5) M^2 berechnet werden. Es ergibt sich $M^2 = 0,89$. M^2 kann theoretisch nicht kleiner als 1 sein. Man kann also die Abweichung zu $M^2 = 1$ mit Messungenauigkeiten bei der Divergenzmessung erklären und davon ausgehen, dass der nach den berechneten Vorgaben entwickelte Laser tatsächlich im Grundmode läuft.

Der Fokus, der sich durch eine Fokussierung des Laserstrahls mit dem x36-Objektiv ergibt, wurde mit dem *BeamMap*-System vermessen. Das von *BeamMap* ermittelte Strahlprofil ist in Abb. 6.14 dargestellt. Der $1/e^2$-Fokusdurchmesser beträgt 9 µm. Die M^2-Messung des *BeamMap*-Systems arbeitete bei der verwendeten Beta-Software noch nicht einwandfrei. Der erzielte Fokusdurchmesser erlaubt jedoch eine einfache Abschätzung, in welchem Maße das Reflexionsobjektiv den ursprünglich beugungsbegrenzten Strahl verschlechtert. Wie oben erwähnt, würde das Objektiv bei Vernachlässigung der Bildfehler einen Fokusdurchmesser von 5,4 µm erzielen. Der tatsächliche Durchmesser beträgt 9 µm, ist also um $M = 1,67$ größer. Das heißt, die Bildfehler des Objektivs verschlechtern die Strahlqualität von $M^2 = 1$ auf $M^2 = 2,8$.

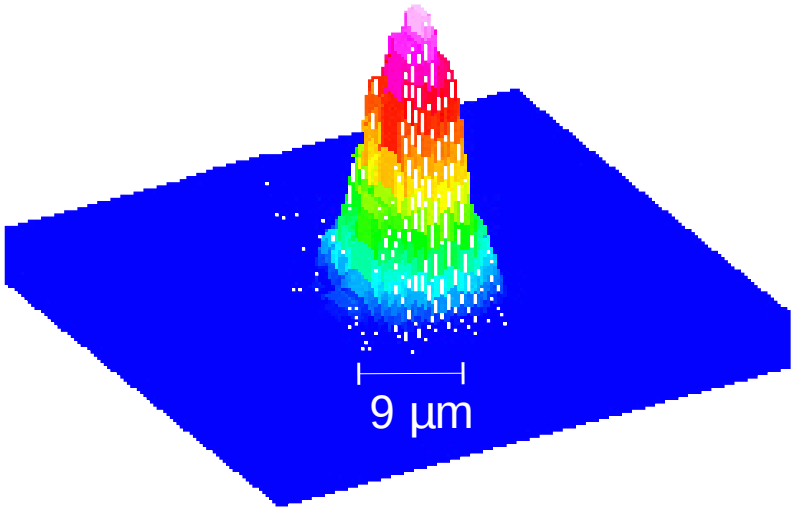


Abb. 6.14.: *Fokusprofil bei Verwendung des x36-Objektivs*

6.3.4. Zusammenfassung

Es ist gelungen, ein den Vorgaben in Kap. 3.4 entsprechendes Lasersystem zu entwickeln. Der Laserresonator wurde nach den Erkenntnissen aus den Resonatorsimulations-Rechnungen gebaut und läuft nachgewiesenermaßen im Grundmode. Mit dem x36-Reflexionsobjektiv der Firma Coherent kann die Strahlung auf Durchmesser kleiner als 10 µm fokussiert werden.

7. Gesamtsystem für die Mikromanipulation

7.1. Konzeption und Aufbau

Um unter Beobachtung gezielt Areale auf einem Objektträger bestrahlen zu können, wurde der IR-Laser an das vorhandene UV-Mikrodissektions-System der Firma P.A.L.M. angekoppelt. Das verwendete Mikroskop ist ein Zeiss-Axiovert 135. Für die Strahlführung der IR-Strahlung können aufgrund der ungenügenden Transmission durch die Standard-Optiken nicht wie bei der UV-Strahlung Teile des Beobachtungsstrahlengangs verwendet werden. Stattdessen wurde eine Einkopplung über den Beleuchtungsstrahlengang realisiert. Die gesamte Anordnung zeigt schematisch die Abb. 7.1.

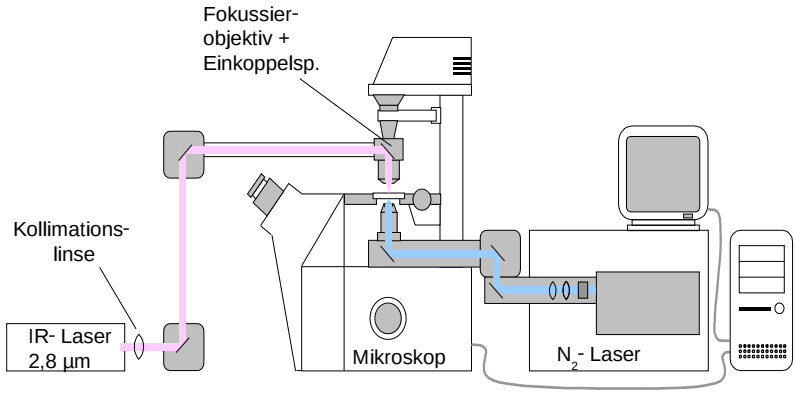


Abb. 7.1.: *Gesamtsystem, bestehend aus dem kommerziellen Mikrodissektions-System Robot-MicroBeam der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologie AG (Bernried) und dem eingekoppeltem IR-Laser*

Der relativ lange optische Weg zwischen Laser und Objektträger erfordert unter Umständen eine Kollimation der Laserstrahlung direkt nach Austritt aus dem Laser, da sonst zu viel Leistung an den Aperturen der nachfolgenden Optik verloren geht. Die bislang verwendete Fokussierlinse hat eine Brennweite von 100 mm. Da sie quasi die Strahltaille, die sich am Auskoppler befindet nach unendlich abbilden muss, beträgt ihr Abstand zum Auskoppler ebenfalls 100 mm.

Anschließend passiert die Strahlung eine aus zwei Umlenkspiegeln bestehende Periskopanordnung. Der obere der Spiegel ist mechanisch fest mit dem höhenverstellbaren Kondensor des Mikroskops verbunden, ebenso die unter dem Kondensor montierte Fokussiereinheit, bestehend aus einem Einkoppelspiegel und dem in Kap. 6.2.2 beschriebenen Reflexionsobjektiv. Damit kann die Fokuslage der IR-Strahlung durch die Höhenverstellung der Kondensoreinheit eingestellt werden.

Insgesamt steht damit also ein System zur Verfügung, mit dem am Mikroskop sowohl die UV- als auch die IR-Strahlung gezielt appliziert werden kann. Die Ausstattung für die UV-Mikrodissektion kann dabei übernommen werden, d.h. auch für den IR-Betrieb können der elektrische Mikroskop-Verschiebetisch, die Videokamera sowie für deren Ansteuerung die Mikrodissektions-Software der Firma P.A.L.M. verwendet werden.

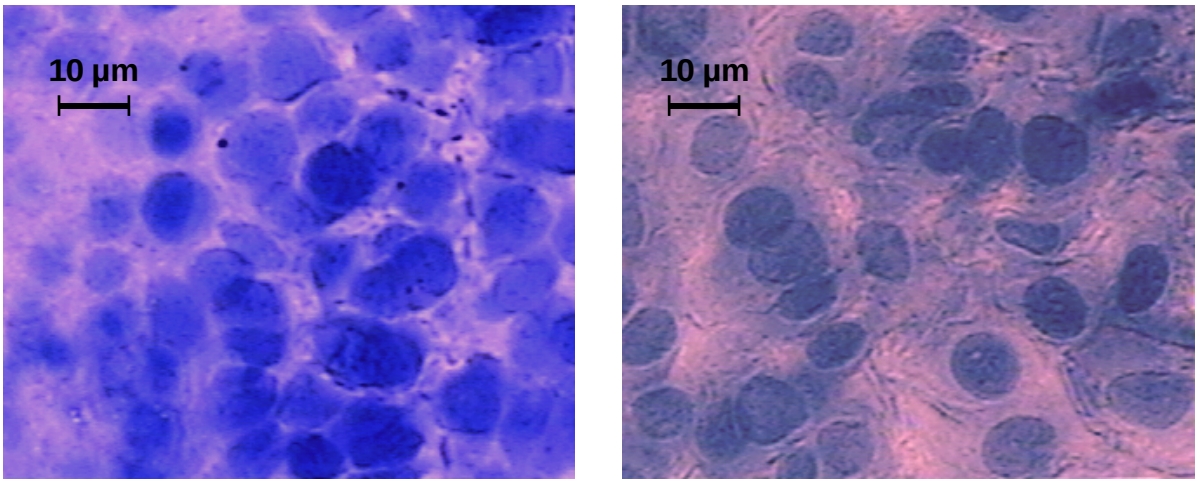
7.2. Optische Eigenschaften

7.2.1. Bildqualität

Der Beobachtungs-Strahlengang des Mikroskops blieb zwar unverändert, nicht jedoch der Beleuchtungsstrahlengang. Dieser erfährt in mehrfacher Hinsicht eine Störung:

1. Der zwischen Kondensor und Reflexionsobjektiv angebrachte Einkoppelspiegel bewirkt eine leichte Farbverfälschung des Beleuchtungslichts, zumal seine Beschichtung nicht für diesen speziellen Fall entwickelt worden war. Insgesamt ergibt sich ein leichter Rotstich, der jedoch leicht durch entsprechende Korrektureinstellungen bei der Software ausgeglichen werden kann.
2. Der Abstand der Kondensoreinheit zum Objektträger wird durch die Fokuslage der IR-Laserstrahlung bestimmt, ist also nicht mehr frei wählbar. Eine vollständige Köhlerung ist damit nicht mehr durchführbar.

3. Der Mikroskopkondensor fokussiert das Beleuchtungslicht mit einer numerischen Apertur von 0,3. Das Reflexionsobjektiv (NA=0,4) bewirkt nun eine weitere noch stärkere Fokussierung. Das Objekt wird dadurch mit einer extrem hohen numerischen Apertur beleuchtet. Durch die dabei auf dem Objekt entstehenden Schatten, ergibt sich ein reliefartiges Bild, das Höheninformationen enthält. Die Abb. 7.2 zeigt am Beispiel von Ratten-Tumorzellen (C6) einen Vergleich der Bildqualität gegenüber der bisherigen ungestörten Beleuchtung.



(a) Beleuchtung durch den 0,3-Kondensor zzgl. einer Vorsatzoptik, die eine numerische Gesamtapertur von 0,5 ergibt (geköhlert)

(b) Beleuchtung durch Kondensorlinse (NA 0,3), Einkoppelspiegel und Reflexionsobjektiv

Abb. 7.2.: *Aufnahmen von C6-Zellen mit 40-facher Vergrößerung bei unterschiedlicher Beleuchtung (Ausschnitt)*

Im Ergebnis kann die Bildqualität trotz der massiven Eingriffe in den Beleuchtungs-Strahlengang als gut bezeichnet werden. Die hohe Beleuchtungsapertur lässt die Ränder der Zellen besonders deutlich hervortreten, so dass je nach Objekt sogar eine Verbesserung der Konturenschärfe festgestellt wird.

7.2.2. Laserfokus und Zielstrahl

Wenn der Laserkristall gepumpt wird, fluoresziert er in einem gelb-grünen Licht. Es handelt sich um einen strahlenden Übergang von Elektronen, die durch einen Upconversionprozess aus dem oberen Laserniveau auf in der Abb. 4.1 nicht dargestellte höhere Niveaus gelangt sind. Die Fluoreszenzwellenlänge beträgt etwa 550 nm. Bei einer entsprechenden Beschichtung der Spiegel könnte diese Emission auch zu einem Laserbetrieb gebracht werden (Upconversion-Laser). In unserem Fall sind die Spiegel jedoch im Sichtbaren nahezu transparent, d.h. die Verstärkung im Laserkristall ist äußerst gering und damit eine Laseraktivität nicht zu erwarten.

Es zeigte sich, dass dieses Fluoreszenzlicht unter dem Mikroskop als kleiner Fokus auf dem Objektträger zu sehen ist. Die laterale Lage dieses Fokus gibt die des eigentlichen Infrarot-Fokus genau wieder und die axiale Lage immerhin noch relativ gut. Damit ist also sozusagen als Nebeneffekt ein Zielstrahl verwirklicht.

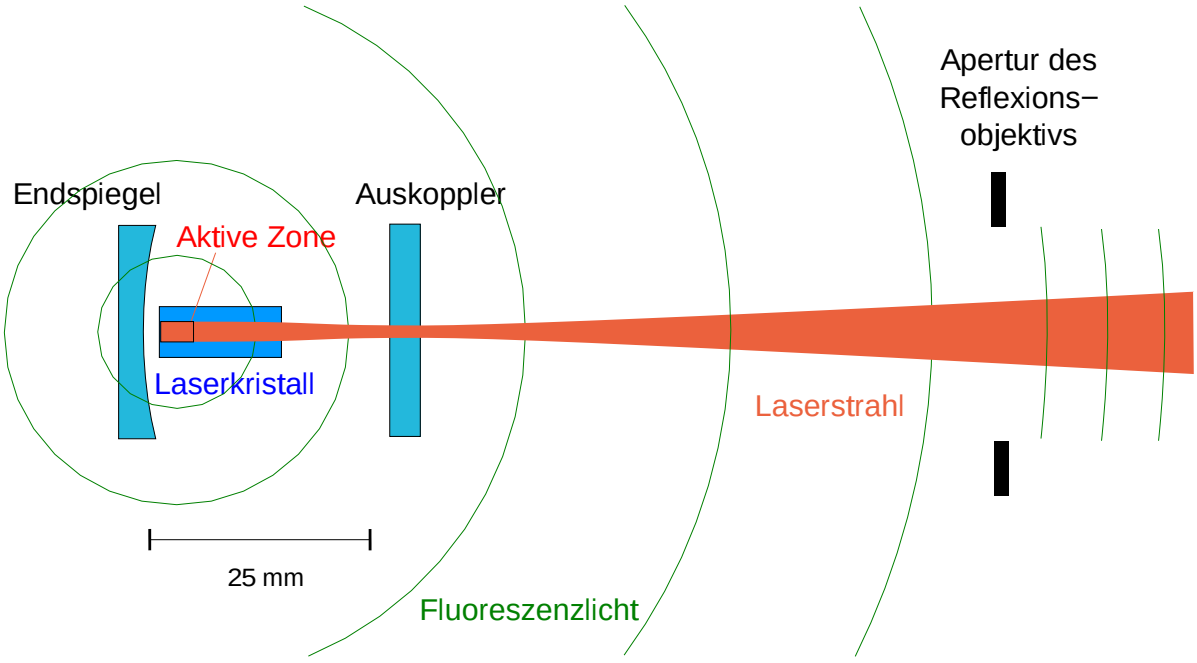


Abb. 7.3.: *Schematische Darstellung der Strahlverläufe von Laserstrahl und Fluoreszenz*

Dass die Foki von grüner Fluoreszenz und Infrarot-Strahl aufeinander liegen, kann mit ihrem gemeinsamen Ursprung erklärt werden (Abb. 7.3). Der Ausgangspunkt beider Strahlungen ist der gepumpte Bereich im Laserkristall (aktive Zone). Während nun der IR-Strahl gerichtet den Laser verlässt, ist die Fluoreszenz weitgehend isotrop, kann also bezüglich des geometrischen

Strahlverlaufs wie eine Kugelwelle behandelt werden. Nur der Anteil der Fluoreszenzstrahlung, der kollinear mit dem Laserstrahl verläuft, erreicht ebenfalls das Reflexionsobjektiv. Damit ist klar, dass die laterale Lage weitgehend identisch sein muss.

Die axiale Lage erfährt einen kleinen Fehler, da die Strahltaille des Lasers am Ort des Auskopplers liegt, der Ausgangspunkt der angenommenen Fluoreszenz-Kugelwelle jedoch der Laserkristall ist. Der Fehler lässt sich jedoch leicht abschätzen: Diese Orte größter Leistungsdichte liegen etwa 25 mm auseinander. Die gemessene Divergenz am Laserausgang beträgt wie in Kap. 6.3.3 gezeigt etwa 5,8 mrad. Die numerische Apertur des x25-Reflexionsobjektivs beträgt 0,4 rad = 400 mrad, ist also etwa 69 mal größer. Damit wird der axiale Abstand nach der Fokussierung etwa 69 mal kleiner sein als am Ort des Lasers, d.h. ca. 360 µm. Der Laser-Fokus liegt also etwa 360 µm näher am Fokussierobjektiv als der Zielstrahl-Fokus.

Eine Voraussetzung für die Verwendung des Zielstrahls ist das Weglassen des in Abb. 6.1 dargestellten Germanium-Filters, der für sichtbares Licht nicht transparent ist. Der Anteil an Pumpstrahlung, die nicht im Laserkristall absorbiert wird, beträgt 8,5% und nur ein Bruchteil davon erreicht letztlich den Objektträger. Daher kann in der Praxis auf den Filter tatsächlich verzichtet werden.

8. Vergleich zwischen thermischer Simulation und Experiment

Die in Kapitel 3 simulierten Temperaturverteilungen in Zell-Monolayern bildeten den Ausgangspunkt für die Laserentwicklung. Nachdem ein entsprechendes System nun zur Verfügung steht, soll die Gültigkeit der Rechnersimulation auf experimentellem Weg nachgewiesen werden. Es wurden mehrere Ansätze überprüft, mit denen lokale Temperaturverteilungen innerhalb einer dünnen Schicht gemessen werden können:

1. Messung des temperaturabhängigen Fluoreszenzspektrums von in Zellmembranen eingebauten Farbstoffen wie z.B. Laurdan [21][19]. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass damit ein Online-Monitoring möglich wäre, also die direkte Messung einer Temperaturänderung am Zellmaterial während der Bestrahlung. Die Ergebnisse sind jedoch stark von Zelltyp und Zellalter abhängig, so dass eine absolute Temperaturkalibrierung schwierig ist.

2. Messung der Wärmestrahlung: Die Messung der vom Objekt ausgesandten Infrarotstrahlung ermöglicht Rückschlüsse auf die Objekttemperatur. Hierzu durchgeführte Experimente zeigten jedoch, dass die Empfindlichkeit der verwendeten Geräte für genauere Temperaturbestimmungen nicht ausreicht, sobald eine Ortsauflösung im Mikrometermaßstab gegeben sein soll.

3. Indirekte Temperaturmessung über beobachtbare Materialveränderungen: Eine Messung temperaturabhängiger Effekte ermöglicht indirekt eine Aussage über die Temperaturverteilung, sofern der Effekt eindeutig erkennbar und einer Temperatur zuordenbar ist. Die beim Siedepunkt einsetzende Verdampfung von Wasser hierzu auszunutzen, erscheint zunächst attraktiv. Durch Blasenbildung aufgrund im Wasser gelöster Gase und

durch einen möglichen Siedeverzug ist die sichere Bestimmung des Siedepunkts und eine Zuordnung zu 100°C jedoch nicht gegeben. Auch eine Bestimmung der örtlichen Temperaturverteilung wäre schwierig.

Der schließlich verwirklichte Ansatz benützt die Koagulation von Hühnereiweiß, die sehr genau untersucht ist. Theoretische Grundlage hierfür bildet der Arrheniusformalismus, der im Folgenden beschrieben wird. Gleichzeitig wird damit ein Verfahren aufgezeigt, mit dem den unterschiedlichen Reaktionen von verschiedenen Zelltypen auf Wärme messbare Kenngrößen zugeordnet werden können.

8.1. Arrhenius-Formalismus

Der Arrhenius-Formalismus[1] erlaubt u.a. eine Abschätzung des Denaturierungsgrades von Proteinen bei thermischer Belastung. Nach Arrhenius kann die Reaktionsgeschwindigkeit k' irreversibler chemischer Reaktionen abgeschätzt werden durch:

$$k' \;=\; A \cdot \exp\left(\frac{-E}{R \cdot T}\right) \tag{8.1}$$

Hierbei sind A und E die sog. Arrheniusparameter, $R = 8,314\,\mathrm{JK^{-1}mol^{-1}}$ die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Die genaue Herleitung dieses Zusammenhangs erfordert ausgiebige Rückgriffe auf die Thermodynamik und Thermostatistik. Sie findet sich z.B. in [14]. Hier soll stattdessen eine anschauliche Betrachtung versucht werden. Das Schema der zugrundeliegenden Reaktionskinetik ist in Abb. 8.1 dargestellt. Durch Wärmezufuhr werden Moleküle in einen aktiven Zustand gebracht. Man kann nun vereinfacht davon ausgehen, dass sich die Ausgangsmoleküle (in Grund- und Anregungszustand) näherungsweise in einem thermischen Gleichgewicht befinden, so dass der Boltzmannsche[2] Verteilungssatz gilt. Das Verhältnis der Zahl von aktiven zu nicht aktiven Molekülen beträgt:

$$\frac{n_A}{n_G} \;=\; \Delta g * \exp\left(\frac{-E_A}{k \cdot T}\right) \tag{8.2}$$

E_A ist die Aktivierungsenergie und $k \approx 1,38 \cdot 10^{-23}\,\mathrm{J/K}$ die Boltzmann-Konstante. Δg steht für die Differenz der Anzahl an Freiheitsgraden. Mit einer bestimmten Rate k' werden nun

[1] Svante August Arrhenius, 1859-1927, schwed. Chemiker
[2] Ludwig Boltzmann, 1844-1906, österr. Physiker

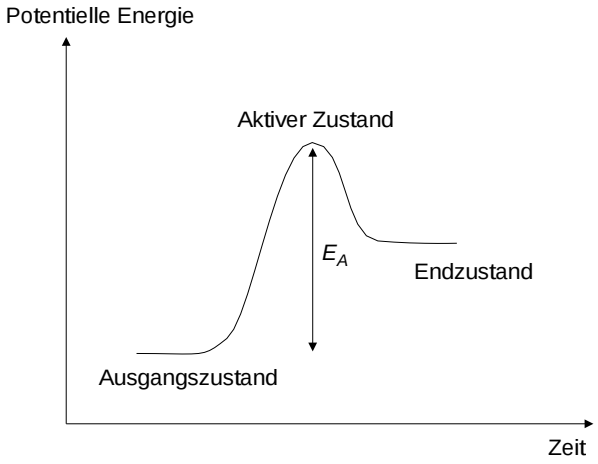


Abb. 8.1.: *Reaktionskinetik nach [23]*

diesem Gleichgewicht aktive Moleküle entzogen und gelangen in einen Endzustand, der in unserem Fall der Denaturierung entspricht. Es wird vorausgesetzt, dass dieser Prozess das thermische Gleichgewicht nicht wesentlich stört, dass also die Wiederherstellung des Gleichgewichts viel schneller als k' ist. Die Rate k' ist die Anzahl an Molekülen, die pro Zeiteinheit denaturiert werden, bezogen auf die Zahl der Moleküle im Ausgangszustand. Sie ist proportional zu der Anzahl der aktiven Molekülen und der Temperatur. Damit gilt

$$k' \propto \frac{n_A}{n_G} \cdot T \tag{8.3}$$

Hier kann nun (8.2) eingesetzt werden. Ein direkter Vergleich mit (8.1) ergibt dann für die Arrheniusparameter folgenden Zusammenhang:

$$A \propto \Delta g \cdot T \qquad \text{und} \qquad E = \frac{E_A \cdot R}{k} = E_A \cdot N_L \tag{8.4}$$

N_L ist die Loschmidt-Zahl[3], also die Zahl der Moleküle in 1 mol der Substanz. Damit ist also der Parameter E die Aktivierungsenergie bezogen auf 1 mol. A enthält als wichtigen Bestandteil Δg, das in der Thermodynamik der Entropieänderung ΔS entspricht:

$$\Delta S = k \cdot \ln \Delta g. \tag{8.5}$$

Bei der Proteindenaturierung ist die Aktivierungsenergie E oft ungewöhnlich hoch (mehrere hundert kJ/mol). Diese geht in (8.1) exponentiell ein. Dennoch werden sinnvolle Werte für k'

[3]Joseph Loschmidt, 1821-1895, österr. Physiker

ermittelt, da A den Exponentialteil ausgleicht. A erreicht dabei Werte bis $10^{80}\,\mathrm{s}^{-1}$ und mehr. Dies bedeutet, dass bei der Denaturierung von Proteinen ungewöhnlich viele neue Freiheitsgrade geschaffen werden, die Entropie also massiv erhöht wird.

k' kann als eine „Zerfallskonstante“ analog zum radioaktiven Zerfall gesehen werden. Für die Konzentration der nativen Moleküle gilt also:

$$c_n(t) \;=\; c_n(0) \cdot \exp(-k't) \tag{8.6}$$

Ist die Temperatur nicht zeitlich konstant, muss im Exponenten statt $k't$ das Integral über der Zeit

$$\Omega(t) \;=\; \int_0^t k'\,dt \;\;=\;\; A \cdot \int_0^t \exp\left(\frac{-E}{R \cdot T}\right)\,dt \tag{8.7}$$

eingesetzt werden. Die Temperaturabhängigkeit von A wurde hierbei gegenüber dem Exponentialfaktor vernachlässigt und A vor das Integral gezogen. Damit wird also der zeitliche Verlauf der Konzentration beschrieben durch:

$$c_n(t) \;=\; c_n(0) \cdot \exp(-\Omega(t)) \tag{8.8}$$

Ω heißt „Schädigungsintegral“. Nach allgemeiner Übereinkunft gelten proteinhaltige Substanzen als irreversibel geschädigt, wenn $\Omega \geq 1$ wird. Dies bedeutet einen Koagulationsgrad von über 63%. Die Willkür in dieser Festlegung ist jedoch nicht kritisch, da das Schädigungsintegral auf Temperaturänderungen sehr sensibel reagiert. Hierzu ein Beispiel: Die Proteinlösung mit den Arrheniusparametern $A = 1,38 \cdot 10^{82}\,\mathrm{s}^{-1}$ und $E = 562,2\,\mathrm{kJ/mol}$ (siehe Gl. (8.10)) sei einer konstanten Temperatur von 85°C ausgesetzt. Dann wird eine 63-prozentige Denaturierung nach 0,72 s und eine 86,5-prozentige Denaturierung nach 1,44 s erreicht. Beträgt die Temperatur nur 5°C mehr, also 90°C, ergeben sich die entsprechenden Zeiten zu 54 ms bzw. 107 ms, also ca. eine Größenordnung niedriger.

Um Substanzen mit verschiedenen Arrheniusparametern miteinander vergleichen zu können, ist es sinnvoll, eine sog. kritische Temperatur T_{krit} einzuführen, die als die (konstante) Temperatur definiert ist, bei der die Substanz nach 1 s irreversibel geschädigt ist, also $\Omega(1\,s) = 1$ gilt. Sie lässt sich aus Gl. (8.7) leicht ableiten zu

$$T_{krit} \;=\; \frac{E}{R \cdot \ln A} \tag{8.9}$$

und beträgt für das obige Beispiel 84,3°C.

8.2. Experiment zur Eiweißkoagulation im Vergleich zur Simulation

Für die definierte Denaturierung von Hühnereiweiß (Albumin) wurde ein dünner Film Albumin auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt (Abb. 8.2). Die Schichtdicke wurde anhand von Absorptionsmessungen ermittelt und betrug etwa 6 µm. Der $1/e^2$-Fleckdurchmesser der Laserstrahlung am Ort der Probe wurde mit der Knife-Edge-

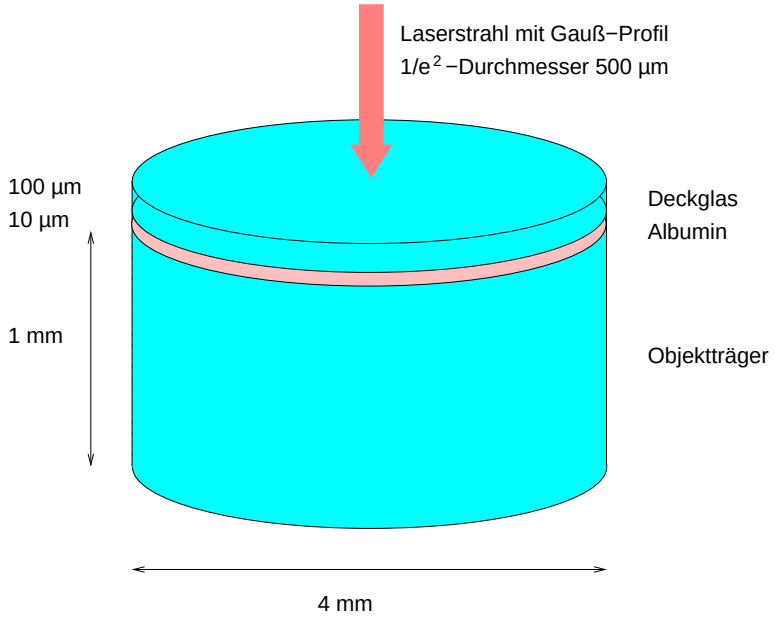


Abb. 8.2.: *Anordnung für Koagulationsmessungen*

Technik bestimmt und betrug ca. 500 µm. Die Laserleistung betrug etwa 100 mW. Nun wurden mit unterschiedlichen Bestrahlungsdauern Koagulationspunkte gesetzt. Diese werden unter dem Mikroskop aufgrund ihres veränderten Streuverhaltens sichtbar. Die Ergebnisse zeigt Abb. 8.3. Die Bilder wurden im Kontrast nachbearbeitet, um die denaturierten Bereiche deutlicher hervorzuheben.

Die Durchmesser der denaturierten Bereiche wachsen mit der Bestrahlungsdauer. Dies ist verständlich, da der Laserstrahl ein Gaußprofil aufweist, so dass im zentralen Bereich schneller kritische Temperaturen erreicht werden als am Rand. Es ist genau diese Abhängigkeit, die den Vergleich mit der Simulation ermöglicht. Hierzu wurde ein der Abb. 8.2 entsprechendes Mo-

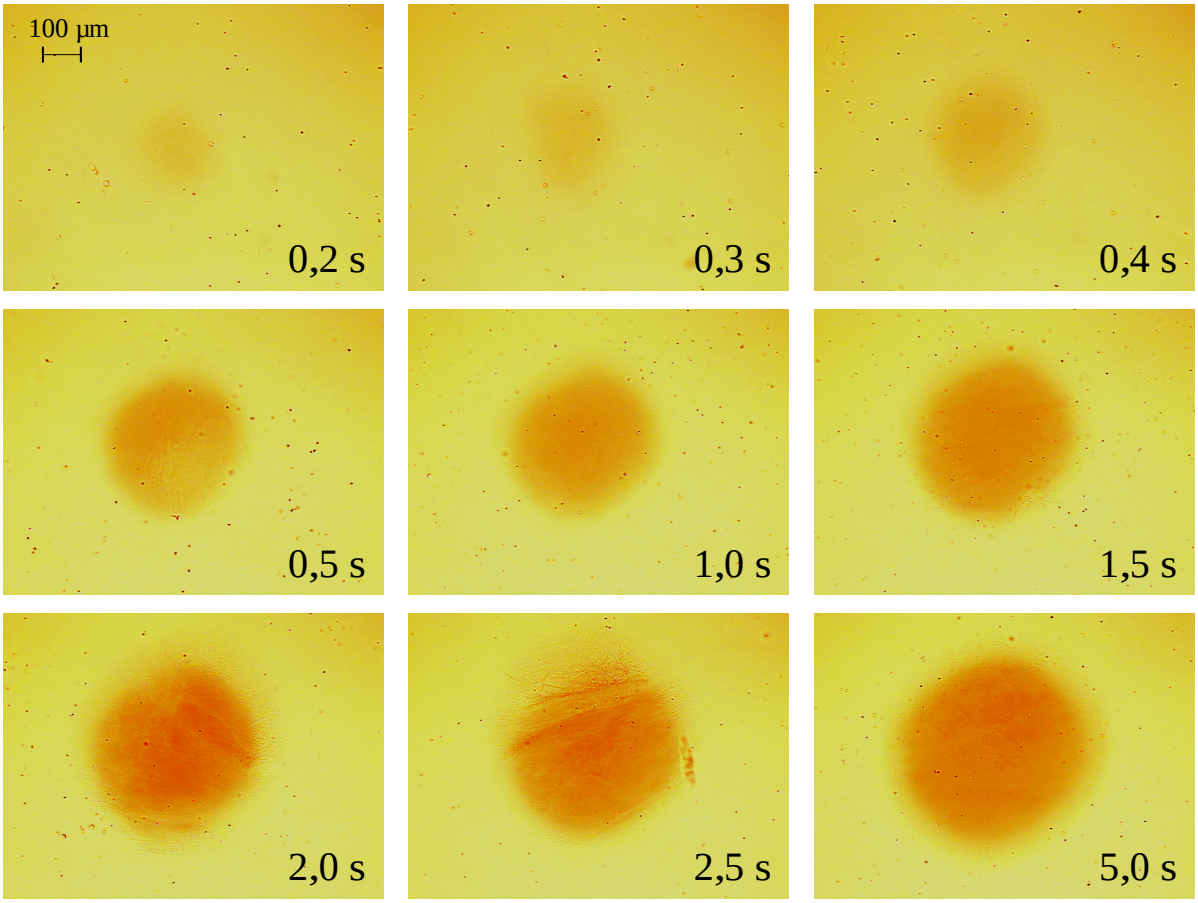


Abb. 8.3.: *Koagulationspunkte bei unterschiedlichen Bestrahlungsdauern*

dell angenommen. Es wurde allerdings mit einer Schichtdicke von 10 µm statt 6 µm gerechnet. Dadurch konnten die Voxel der Finiten-Differenzen-Rechnung größer gewählt werden (10 µm mal 10 µm), was einen erheblichen Vorteil in der Rechnengeschwindigkeit bedeutet. Die anders gewählte Schichtdicke hat jedoch keine bedeutenden Auswirkungen auf das Ergebnis, solange angenommen werden kann, dass die gesamte einfallende Energie absorbiert wird. Eine größere Unsicherheit bestand bezüglich der Laserleistung, die aufgrund der thermischen Linsenwirkung nicht immer reproduzierbare Schwankungen durchläuft. In der Simulation wurde stets mit konstanten mittleren Leistungen gerechnet.

Die berechneten zeitlichen Temperaturverläufe zeigt die Abb. 8.4 für unterschiedliche Entfernungen zum Zentrum der Laserstrahlung. In Abbildung 8.5 ist die räumliche Temperaturverteilung nach einer Bestrahlungsdauer von 1 s farbkodiert wiedergegeben, wie sie vom Programm angezeigt wird, das in Zylinder-Geometrie rechnet. Links oben ist das Zentrum der Einstrahlung. Nach rechts ist die radiale, nach unten die axiale Richtung dargestellt. Man

erkennt, dass die Strahlung vorwiegend in der Albuminschicht absorbiert wird, zu einem kleinen Teil jedoch auch im Deckglas, das sich daher stärker erwärmt als der darunterliegende Objektträger.

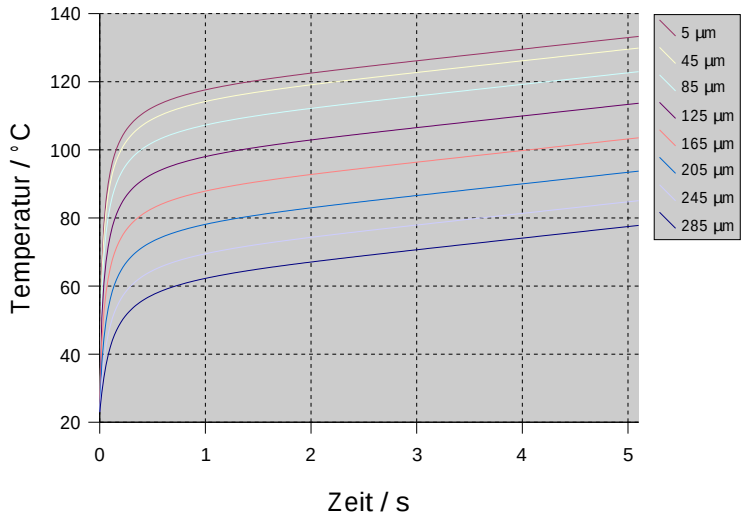


Abb. 8.4.: *Temperaturverläufe in verschiedenen Abständen zum Zentrum der Bestrahlung*



Abb. 8.5.: *Räumliche Temperaturverteilung nach einer Bestrahlungsdauer von 1 s*

Die Abb. 8.6 ist eine vergleichende Darstellung der berechneten Temperaturverteilung in der Eiweißschicht nach 1 s, diesmal in Draufsicht, und dem Experiment. Dem gelben Kreis, der

die Grenze des koagulierten Bereichs markiert, kann aus dem berechneten Bild links direkt eine Temperatur zugeordnet werden, auf die weiter unten noch eingegangen wird.

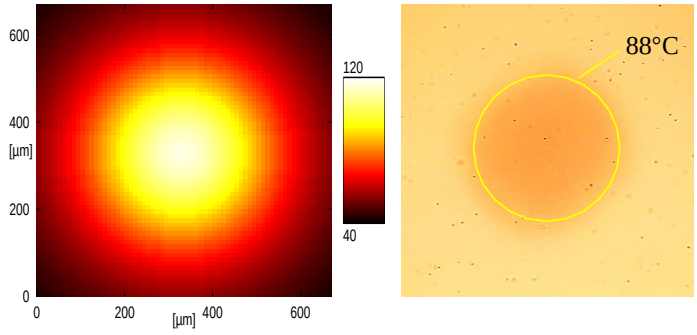


Abb. 8.6.: *Temperaturverteilung nach 1 s im Vergleich zum Experiment*

Die Temperaturen allein lassen noch keine Rückschlüsse auf eine Denaturierung zu. Mit dem verwendeten Programm können jedoch auch die Werte der Schädigungsintegrale an den verschieden Orten berechnet werden (Abb. 8.7).

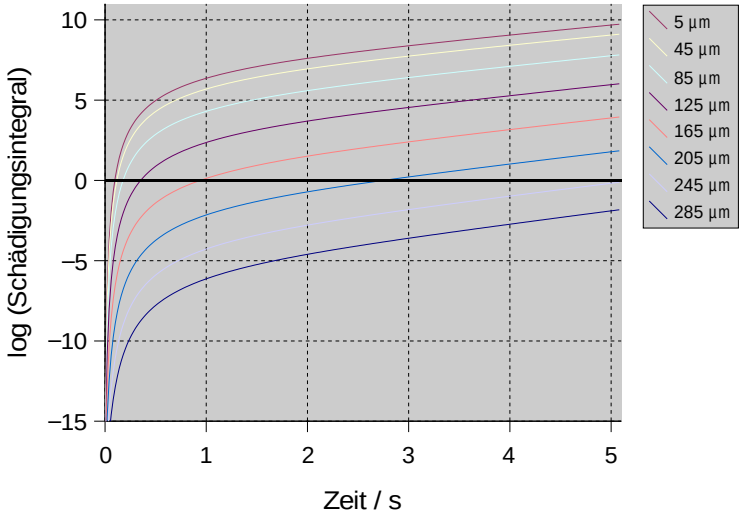


Abb. 8.7.: *Verläufe der Schädigungsintegrale in verschiedenen Abständen zum Zentrum*

Die hierbei verwendeten Arrheniusparameter sind der Literatur entnehmbar. Johnson et al. haben in [14] E und k' angegeben, woraus sich mit Gl. (8.1) A ableiten lässt. Weiterhin ist zu beachten, dass E und k' vom pH-Wert der Umgebung (z.B. Wasser) abhängen. In unserem Fall stellt das Albumin selbst die Umgebung dar. Nach [31] liegt der pH-Wert von Hühnereiweiß zwischen 7,6 und 8,0. Für einen pH-Wert von 7,7 ergeben sich aus [14] und Gl. (8.9) folgende Parameter:

$$A = 1,38 \cdot 10^{82}\,\mathrm{s}^{-1} \;,\; E = 562179,8\,\mathrm{J/mol} \;,\; T_{krit} \approx 84,3^{\circ}\mathrm{C} \tag{8.10}$$

Die kritische Temperatur liegt etwas niedriger als dem Koagulationsrand in Abb. 8.6 zugeordnet worden war. Der Grund liegt darin, dass man bei der kritischen Temperatur davon ausgeht, dass sie konstant 1 s lang vorliegt, was, wie in Abb. 8.4 gezeigt, nicht gegeben ist. Wenn also bei einer ansteigenden Temperatur bereits nach 1 s ein Effekt erzielt wurde, muss sie zu diesem Zeitpunkt bereits die kritische Temperatur überschritten haben.

Aus Abb. 8.7 lassen sich die Schnittpunkte mit $\Omega = 1$ ablesen[4] und mit den ausgemessenen Radien der Koagulationspunkte in Abb. 8.3 vergleichen. Die Koagulationsränder weisen eine gewisse Unschärfe auf. Bei der Bestimmung der Durchmesser wurde jeweils etwa bezüglich der Mitte des Unschärfebereiches gemessen, der bereits beschriebenen Tatsache Rechnung tragend, dass $\Omega = 1$ keiner vollständigen, sondern einer 63-prozentigen Koagulation entspricht. Außerdem wurden in horizontaler und vertikaler Richtung aufgenommene Messwerte gemittelt.

[4] Man beachte die logarithmische Auftragung, d.h. es interessieren die Werte bei $\log \Omega = 0$.

Das Ergebnis ist in Abb. 8.8 dargestellt. Die bei den Messwerten eingezeichneten Fehlerbalken verdeutlichen die Ableseunsicherheit bei der Ausmessung der Koagulationspunkte.

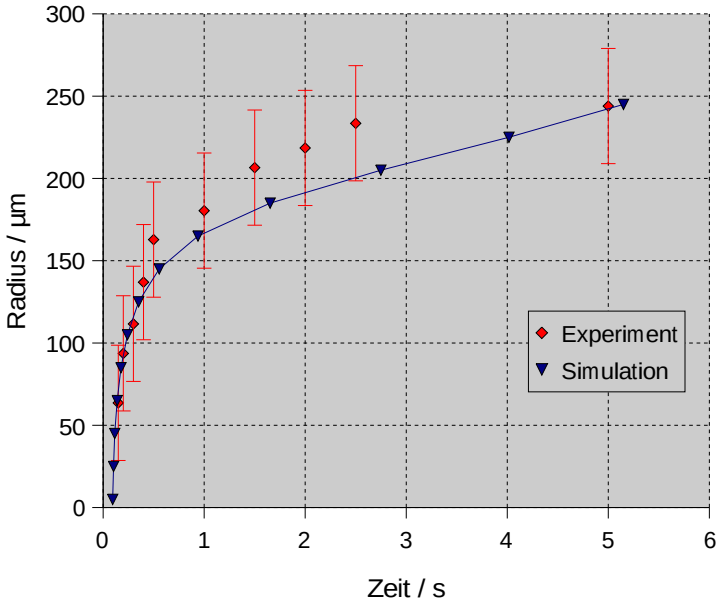


Abb. 8.8.: *Vergleich zwischen gemessenen Koagulationsradien und den in der Simulation berechneten Werten (durchgezogene Kurve)*

Die Messwerte liegen anfänglich etwas über den simulierten Werten. Eine hierfür mögliche Erklärung ist das in der Abb. 6.9 dargestellte und in der Simulation nicht berücksichtigte zeitliche Verhalten der Laserleistung. Die gute Übereinstimmung zum Experiment ist ein indirekter Nachweis dafür, dass die Simulation in Bezug auf die berechneten Temperaturverteilungen (Abb. 8.4 und 8.5) auch quantitativ befriedigende Voraussagen macht.

9. Anwendungsbeispiele

Noch bevor der Erbium-cw-Laser an das Mikroskop angekoppelt war, wurden bereits einige Stimulations- und Schneideversuche mit dem Laser durchgeführt, um die prinzipiellen Auswirkungen der Infrarot-Strahlung auf biologische Materialien zu untersuchen. Diese Experimente belegen die Eignung des Lasersystems im Hinblick auf die in Kapitel 2 dargelegten Fragestellungen in der Biologie.

9.1. Großflächige Bestrahlung von Zell-Monolayern

In Analogie zu den Albuminexperimenten aus Kapitel 8 wurden ebenfalls relativ großflächig Zell-Monolayer bestrahlt. Unter „großflächig“ ist hierbei ein Fokusdurchmesser von 400 µm bis 500 µm zu verstehen. In den Experimenten ging es um die direkte Zellschädigung, die mit einer Trypanblau-Färbung sichtbar gemacht wurde. Die Abbildung 9.1 zeigt eine Versuchsreihe am Beispiel von C6-Rattentumorzellen. Der $1/e^2$-Strahldurchmesser am Ort des Objektträgers betrug 400 µm, die Laserleistung 48 mW.

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit einer verminderten Laserleistung von 18 mW mit Bestrahlungszeiten bis 25 s durchgeführt (Abb. 9.2).

Wie bei Albumin (Abb. 8.3) ergibt sich eine Größenzunahme der geschädigten Zone. Auch hier können die entsprechenden Durchmesser ausgemessen und über der Zeit aufgetragen werden. In Kapitel 8.2 war gezeigt worden, dass die thermische Simulation bei Verwendung des Arrhenius-Formalismus recht gut die experimentellen Gegebenheiten wiedergibt. Deshalb kann auch jetzt wieder die Simulation herangezogen werden, wobei diesmal die Arrheniusparameter A und E so gewählt werden, dass die experimentellen Daten möglichst genau getroffen werden. Die beste Anpassung ergibt sich mit $A \approx 2,5 \cdot 10^{20}\,\mathrm{s}^{-1}$ und $E \approx 130\,\mathrm{kJ/mol}$. Im

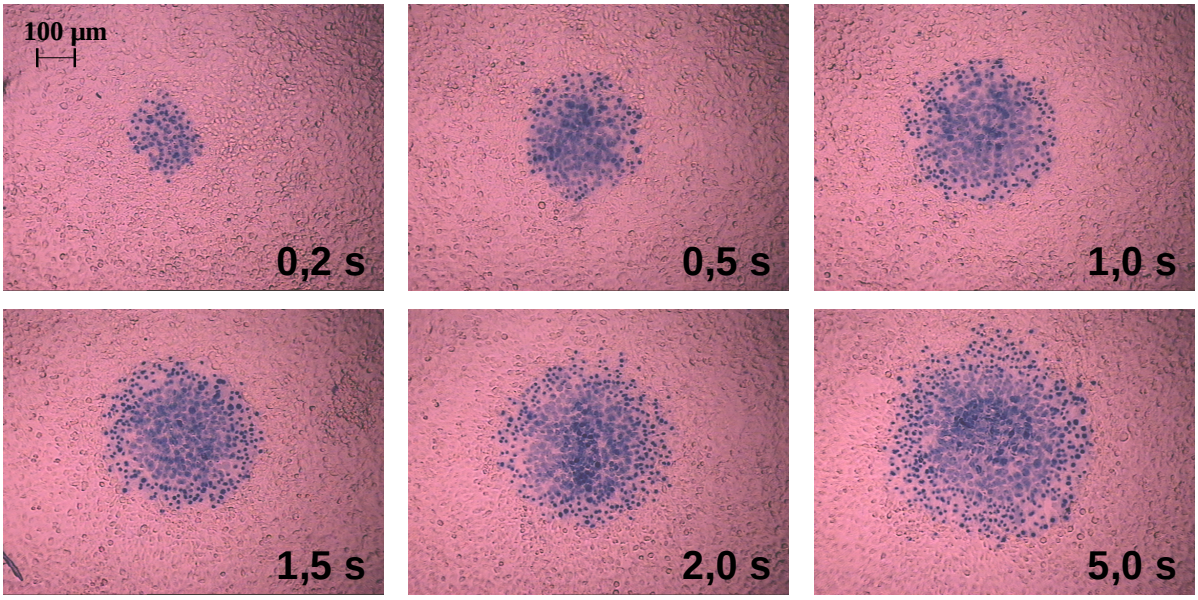


Abb. 9.1.: *Schädigungszonen in einem Monolayer von C6-Zellen (P=48 mW)*

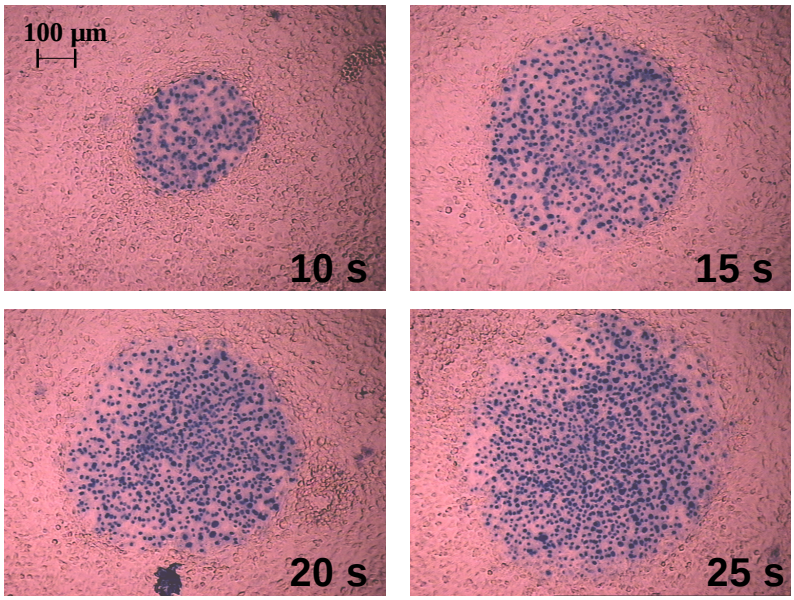


Abb. 9.2.: *Schädigungszonen in einem Monolayer von C6-Zellen (P=18 mW)*

Vergleich zur Eiweißkoagulation zeigen die kleineren Werte für A und E, dass eine geringere Aktivierungsenergie E ausreicht, die Zellen irreversibel zu schädigen und dass damit bei weitem nicht so starke Strukturveränderungen (die durch A beschrieben werden) verbunden sind. Die Ergebnisse sind in der Abb. 9.3 zusammengefasst.

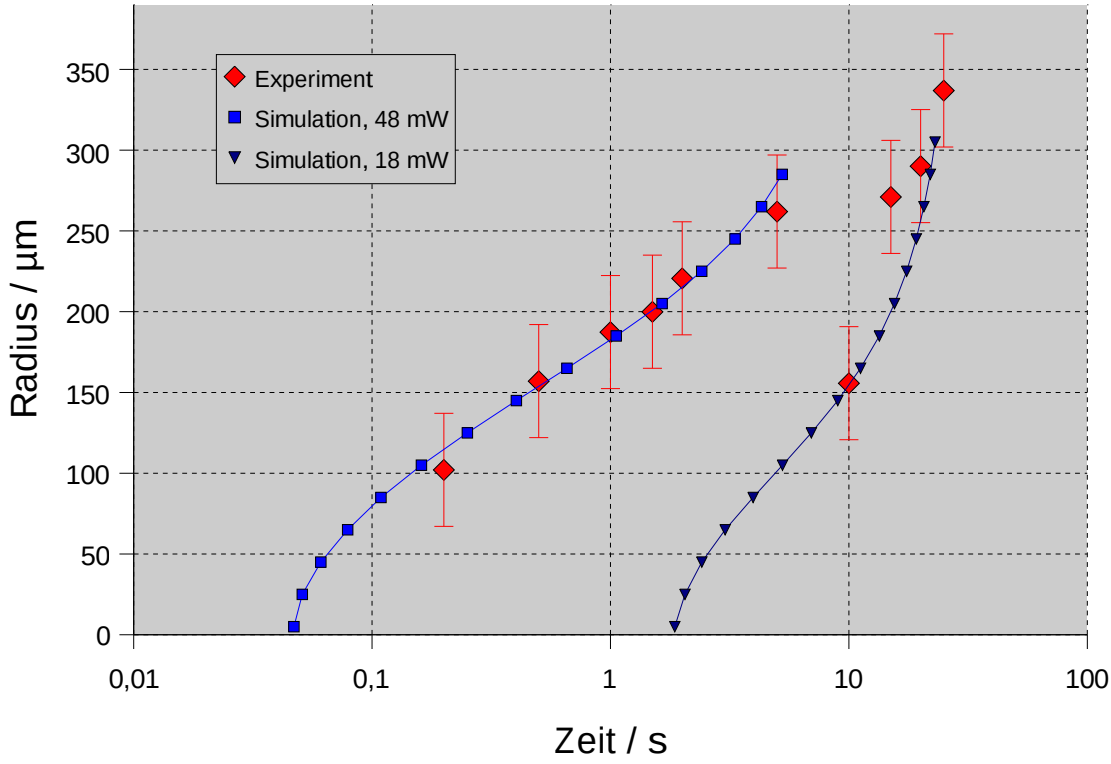


Abb. 9.3.: *Radien der Schädigungszonen im Vergleich zur Simulation*

In der Abbildung sind die experimentellen Daten aus beiden Versuchsreihen eingetragen. Die Fehlerbalken beschreiben wie im Fall des Albumins auch hier die Unsicherheiten beim Ausmessen der geschädigten Bereiche. Vereinzelte größere Abweichungen zur Simulation, wie in diesem Fall der Radius bei einer Bestrahlungszeit von 15 s, lassen sich durch Schwankungen der Laserleistung erklären. Die Werte bis einschließlich 5 s beziehen sich auf eine Laserleistung von 48 mW, ab 10 s von 18 mW. Entsprechend der zwei verwendeten Leistungen sind die zwei zugehörigen simulierten Kurven eingezeichnet. Dass *beide* Kurven den experimentellen Ergebnissen sehr nahe kommen, ist hierbei keineswegs selbstverständlich, da mit der Anpassung der Simulation an die Messwerte bei 48 mW (bis 5 s Bestrahlungszeit) die Arrheniusparameter bereits festgelegt und damit alle Freiheiten ausgeschöpft sind. Die relativ gute Übereinstimmung mit den Werten für Zeiten ab 10 s ist zum einen ein weiterer Hinweis dafür, dass die Simulation in sich konsistent ist. Zum anderen ist damit aber auch gezeigt, dass sich die Schädigung der Zellen tatsächlich mit dem Arrheniusformalismus recht genau beschreiben lässt.

Mit Gl. (8.9) kann den im Experiment verwendeten Zellen eine kritische Temperatur von $T_{krit} = 59,8$°C zugeordnet werden, die deutlich unter der kritischen Temperatur der Albumin-Denaturierung (ca. 85°C) liegt.

Im Gegensatz zum Albumin waren die Zellen nicht durch ein Deckglas abgedeckt, um eine anschließende Trypanfärbung zu ermöglichen. Für die Bestrahlung wurden sie eine Zeit lang aus dem Nährmedium genommen. Es ist daher denkbar, dass die thermische Empfindlichkeit der Zellen durch Austrocknungseffekte beeinflusst wurde, d.h. dass Zellen desto empfindlicher auf Hitze reagieren, je trockener sie werden. Es gibt einen ersten Hinweis dafür, dass dies der Fall ist: Pro Objektträger waren in den Experimenten 12 Bestrahlungen durchgeführt worden. Die erste und die letzte Bestrahlung wurde dabei mit hoher Leistung (ca. 100 mW) vorgenommen, um deutlich sichtbare Referenzpunkte zu erzeugen. Es wurde beobachtet, dass der letzte Referenzpunkt meist größer war als der erste. Am Ende der Bestrahlungsreihe war die thermische Belastbarkeit der Zellen also offensichtlich niedriger als am Anfang.

Um diese Effekte weiter aufzuklären, wären weitere Versuchsreihen erforderlich, insbesondere auch Bestrahlungen bei Anwesenheit von Medium, z.B. „von unten“ durch das Trägermaterial hindurch. Weiterhin können mit der vorgestellten Methode nun auch andere Zell-Linien durch die Ermittlung von T_{krit} auf ihre thermische Sensibilität hin untersucht und miteinander verglichen werden.

9.2. Schneidversuche

Neben der thermischen Schädigung und Stimulation kann der IR-Laser auch für das Schneiden von biologischen Materialien eingesetzt werden. Bei Schneidversuchen mit Zell-Monolayern, die sich direkt auf dem Objektträger befanden, traten jedoch unerwartete Schwierigkeiten auf. Die fokussierte IR-Strahlung trocknet das getroffene Material und brennt die Zellen eher in das Glas ein, als dass sie sie ablöst oder abträgt. Ein Schneiden wird jedoch möglich, wenn sich direkt unter dem zu schneidenden Material eine wässrige Schicht befindet, die verdampft und dadurch den darüberliegenden Zellverband aufreißt. Dies wird im Folgenden an drei Beispielen demonstriert.

9.2.1. Gelunterstützte Schnitte

Eine Möglichkeit, unter ein Zell-Monolayer eine wässrige Umgebung zu bringen, ist eine Sandwich-Anordnung, wie sie in Abb. 9.4 dargestellt ist.

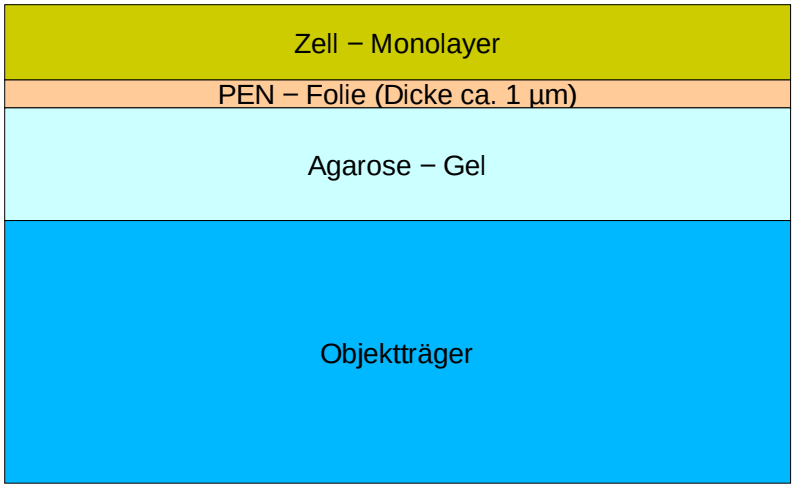


Abb. 9.4.: *Sandwichanordnung zum Schneiden von Zell-Schichten*

Als Substanz für eine wässrige Umgebung wird ein Gel verwendet, hier z.B. Agarose von der Firma Life Technologies (1,5 g gelöst in 100 g doppeldestilliertem Wasser). Nach der sehr schnellen Austrocknung der bestrahlten Zellen dringt die Laserstrahlung in das Gel ein und bringt es lokal zum Verdampfen. Der Dampf reißt die darüberliegende Folie samt der aufliegenden Zellen auf. Die Abb. 9.5 zeigt einen so erzeugten Schnitt in einer PEN[1]-Folie, die etwa 1 µm dick ist. Der Fokusdurchmesser des Laserstrahls betrug 9 µm, die mittlere Laserleistung ca. 9 mW. Der Objektträger wurde etwa mit einer Geschwindigkeit von 280 µm/s durch den Strahl bewegt.

Die Schnittbreite beträgt zwischen 3 und 5 µm, ist also kleiner als der Fokusdurchmesser. Hierfür sind zwei Erklärungen denkbar: Entweder wurden im Zentrum des Gaußstrahls (Abb. 6.14) so hohe Temperaturen erzeugt, dass die Folie dort verdampfte, oder es handelt sich um einen erzeugten Riss, der durch die elastischen Kräfte im Kunststoff etwas auseinanderklafft. Bei diesem Versuch befand sich noch kein Zellmaterial auf der Folie. Es konnte jedoch gezeigt werden [30], dass sich die Zellen auch auf der PEN-Folie kultivieren lassen, so dass die Methode prinzipiell anwendbar sein dürfte.

[1] Polyethylen-Naphthalin

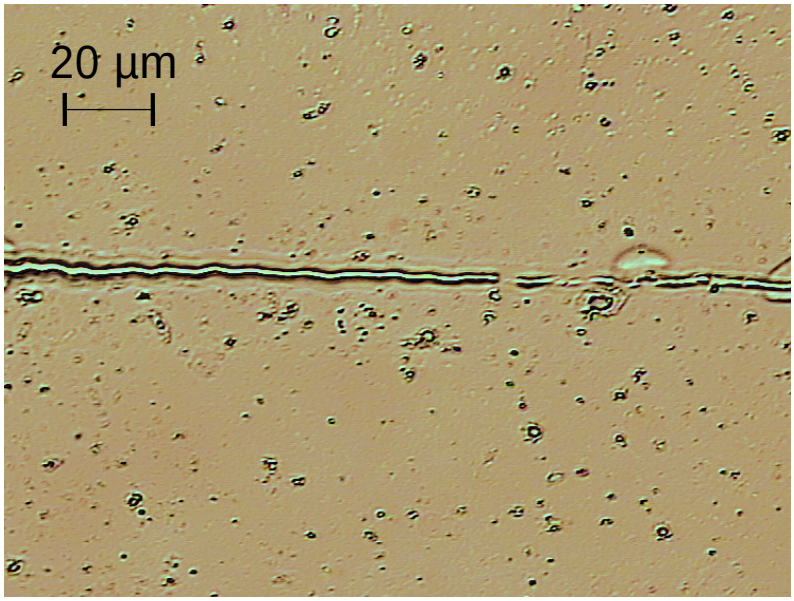


Abb. 9.5.: *Gelunterstützter Schnitt einer PEN-Folie*

9.2.2. Schneiden von Zwiebel-Epidermiszellen

Die feinen Zwischenhäutchen der Küchenzwiebel (Alium cepa) stellen ein biologisches Äquivalent zum Sandwichmodell (Abb. 9.4) dar. Die einzelnen Zellen besitzen einen äußerst hohen Wassergehalt und sind von einer relativ festen Zellmembran umgeben, die im Modell der Folie entspricht.

Im Versuch wurde ein Häutchen auf einen Objektträger gelegt, der wieder mit einer Geschwindigkeit von etwa 280 µm/s bewegt wurde. Der Fokusdurchmesser betrug wie im obigen Fall 9 µm. Es zeigt sich allerdings, dass zum Schneiden eine höhere Leistung als im Fall der PEN-Folie verwendet werden muss. Die Membran der Zwiebelzellen ist offensichtlich wesentlich zäher als die Folie. Bei dem in Abb. 9.6 dargestellten Schnitt betrug die Laserleistung ca. 55 mW.

Die Breite der erzeugten Schnittspur ist mit der Schnittbreite in der PEN-Folie vergleichbar und beträgt zwischen 3 µm und 4 µm. Die obere Membran ist durchgängig geschnitten, die direkt auf dem Objektträger aufliegende jedoch nur selten. Hier macht sich wiederum der Effekt bemerkbar, dass direkt auf dem Glas liegendes Material mit dem Infrarot-cw-Laser nicht einfach zu schneiden ist.

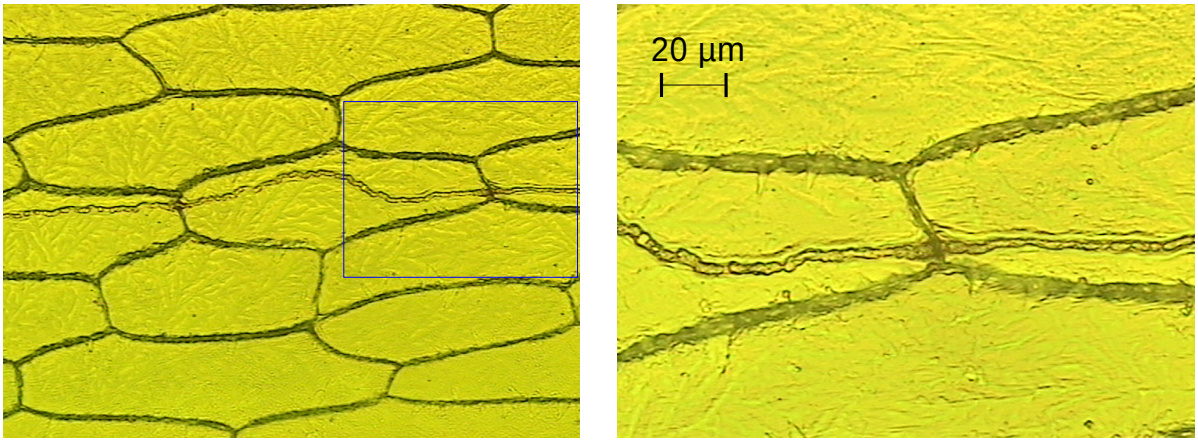


Abb. 9.6.: *Schnittspur in Zwiebel-Epidermiszellen*

9.2.3. Schnitte in Gewebe

Bei Gewebe treten die beschrieben Schwierigkeiten nicht auf, da sich immer unter dem zu schneidenden Material weiteres wasserhaltiges Gewebe befindet, so dass ein Schneiden in die Tiefe problemlos möglich ist. Der entwickelte Laser ist zwar von seiner Leistung her (max. 300 mW) nicht für den chirurgischen Einsatz, d.h. für das Schneiden von Weichgewebe, ausgelegt (dafür wären Leistungen über 1 W sinnvoll), bei einer entsprechend langsamen Schnittgeschwindigkeit können dennoch Schnitte in Gewebe demonstriert werden. Die Abbildungen 9.7 und 9.8 zeigen histologische Aufnahmen von Schnitten in Leber.

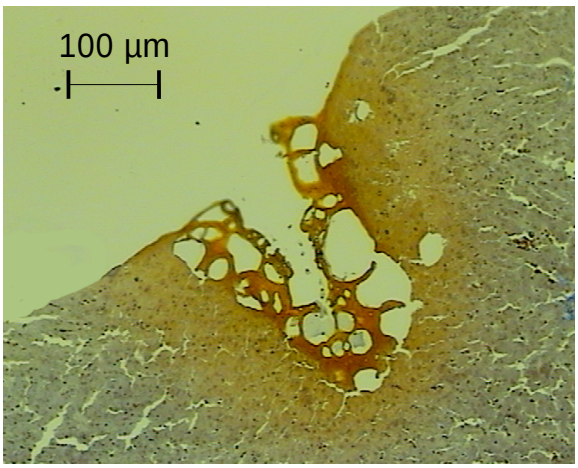


Abb. 9.7.: *Histologische Aufnahme eines Schnitts in Leber, durchgeführt mit dem IR-cw-Laser mit einem Fokusdurchmesser von 90 µm und einer Laserleistung von 180 mW*

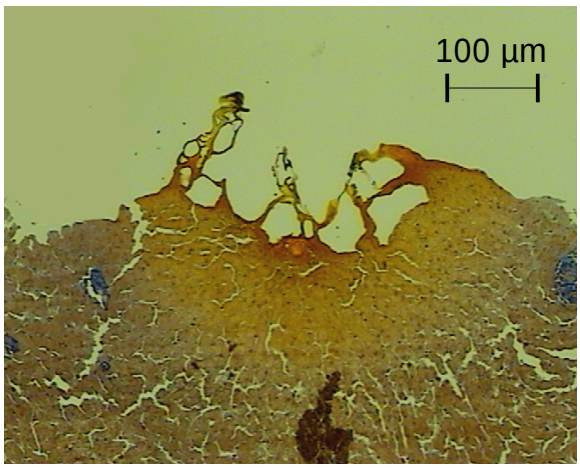


Abb. 9.8.: *Histologische Aufnahme eines Schnitts in Leber, durchgeführt mit dem CO_2-Laser mit einem Fokusdurchmesser von etwa 500 µm und einer Laserleistung von 180 mW*

Die Schnittgeschwindigkeit betrug wieder 280 µm pro Sekunde. Der Schnitt in Abb. 9.7 wurde mit dem IR-Laser bei einem Fokusdurchmesser von 90 µm und einer Leistung von 180 mW durchgeführt. Zum Vergleich zeigt die Abb. 9.8 einen Schnitt mit dem CO_2-Laser, ebenfalls bei einer Laserleistung von 180 mW, jedoch einem größeren Fokusdurchmesser von etwa 500 µm. Die histologischen Schnitte wurden mit Azan gefärbt, so dass die thermisch geschädigten Bereiche deutlich sichtbar werden.

Ein detaillierter Vergleich zwischen dem IR-cw-Laser und dem CO_2-Laser im Hinblick auf mikrochirurgische Aufgabenstellungen, steht bislang noch aus. Die oben dargestellten ersten Versuche hierzu lassen jedoch erkennen, dass sich die Lasersysteme bzgl. der Effekte am Gewebe nicht wesentlich unterscheiden. Dass die IR-Laserstrahlung mit einer Wellenlänge von 2,8 µm aufgrund der höheren Absorption im Gewebe (Abb. 1.1) eine etwa fünf mal kleinere Eindringtiefe hat als die Strahlung des CO_2-Lasers bei 10,6 µm, wirkt sich im cw-Betrieb nicht merklich aus.

Ein bedeutender Vorteil stellt jedoch die kleinere Wellenlänge des IR-Lasers im Hinblick auf die Fokussierbarkeit dar. Unter Beibehaltung des Arbeitsabstandes lässt sich mit dem IR-Laser im Vergleich zum CO_2-Laser ein etwa 3,8 mal kleinerer Fokus und damit kleinere Schnittbreiten erzielen.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines im mittleren Infrarot emittierenden cw-Lasersystems, mit dem innerhalb von Zell-Monolayern eng begrenzte Areale bis hin zu Einzelzellen bestrahlt werden können. Dieses System soll in der biologischen Forschung zur Untersuchung von thermischen Einflüssen auf lebende Zellen eingesetzt werden, wobei gewährleistet sein soll, dass die durch die Bestrahlung induzierte Temperaturerhöhung lokalisiert bleibt.

Für eine Zellschicht auf verschiedenen Trägermaterialien wurden thermische Simulationen, basierend auf der Finite-Differenzen-Methode, durchgeführt. Es zeigt sich, dass mit einem optimal fokussierten Laserstrahl, je nach Leistung und Einwirkdauer erhebliche Temperaturerhöhungen erreicht werden können, während die Temperaturen im Abstand einer typischen Zelldimension moderat bleiben. Erwartungsgemäß ist dieser Temperaturunterschied besonders ausgeprägt für Trägermaterialien mit einer hohen Wärmeleitfähigkeit wie z.B. Saphir.

Nach den sich aus den Simulationen ergebenden Parametern wurde ein diodengepumpter Festkörperlaser entwickelt, der bei 2,8 µm kontinuierlich abstrahlt. Als Lasermaterialien wurden unter anderem Er:YLF und Er:BYF verwendet. Die maximale Laserleistung betrug 300 mW. Das Resonatordesign wurde so berechnet, dass der Laser ausschließlich im Grundmode anschwingt. Für die Fokussierung der Laserstrahlung kam ein Mikroskop-Reflexionsobjektiv zum Einsatz, dessen optischen Eigenschaften mittels eines Optik-Design-Programms nachgebildet werden konnten. Es ist gelungen, den Laserstrahl auf einen Durchmesser von 9 µm zu fokussieren.

Die Laserstrahlung wurde über eine Periskopanordnung in den Beleuchtungs-Strahlengang eines inversen Mikroskops eingekoppelt, ohne die Bildqualität zu verschlechtern. Eine für Erbium typische grüne Fluoreszenz wurde für die Erzeugung eines Zielstrahls ausgenutzt.

Zur Verifikation der thermischen Simulationsrechnungen wurden Albuminschichten lokal denaturiert. Mit Hilfe des Arrheniusformalismus konnte gezeigt werden, dass die experimentellen Ergebnisse mit den Simulationen gut übereinstimmen. Erste analoge Versuche an Lebendzellen wurden mit C6-Rattentumorzellen durchgeführt. Die sich ausbildenden Nekrosezonen wurden mit Trypanblau gefärbt und ausgemessen. Es wurde nachgewiesen, dass auch hier der Arrheniusformalismus anwendbar bleibt. Als kritische Temperatur wurde für die C6-Zellen 59,8°C ermittelt. Es besteht noch Aufklärungsbedarf, inwieweit dieser relativ kleine Wert teilweise auf Austrocknungseffekte zurückzuführen ist.

Insgesamt steht damit ein System zur Verfügung, mit dem Temperatureffekte an Zellen genauer aufgeklärt werden können. Schon mit einer einzelnen defokussierten Bestrahlung kann mit Hilfe der berechneten Temperaturverteilungen ein weiter Temperaturbereich abgedeckt werden. Beispielsweise sollten Effekte, die nur in einem Temperaturintervall auftreten, in Form eines Ringes sichtbar werden, dessen äußerer und innerer Radius direkt den Temperaturgrenzen zugeordnet werden können. Bei exakter Fokussierung lassen sich, wenn die Zellen nicht zu klein sind (Durchmesser$>$20 µm), gezielt Einzelzellen bestrahlen, z.B. zur Erforschung von Signaltransduktions-Mechanismen.

Die Schneideeigenschaften des IR-Lasers wurden an Zwiebel-Epidermiszellen und Gewebe demonstriert. Für Zell-Monolayer wurde ein Verfahren entwickelt, das über die Verdampfung eines unterlegten Gels ebenfalls ein Schneiden ermöglicht. Der Vergleich dieses Ansatzes mit der herkömmlichen UV-Mikrodissektion ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Steiner, der es mir ermöglichte, diese Arbeit am ILM durchzuführen, mich in dieser Zeit betreute und der sich als Hauptgutachter zur Verfügung stellte. Mein Dank gilt weiterhin dem zweiten Gutachter, Herrn Prof. Dr. R. Hibst. Von ihm stammt auch der sehr gewinnbringende Vorschlag, einen indirekten Temperaturnachweis über die Eiweiß-Koagulation zu führen.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. T. Meier, dem Projektleiter des MIDIS-Projekts, in das diese Arbeit eingebunden war. Ich verdanke ihm viele Verbesserungsvorschläge und er stand für wichtige Diskussionen physikalischer Sachverhalte immer zur Verfügung.

Für die Unterstützung bei den Messaufbauten und den durchgeführten Messreihen danke ich Herrn Dipl.-Ing. (FH) Markus Rupp, der in den letzten zwei Jahren mein engster Mitarbeiter war, sowie Frau Dipl.-Biol. Kathia Vilpoux, mit deren Hilfe die Versuche an biologischen Materialien durchgeführt wurden.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Zimmergenossen Dipl.-Phys. Detlef Russ bedanken. Er war in der ganzen Zeit stets ein wichtiger Ansprechpartner für auftauchende Fragen. Wichtige Teile der Arbeit benützen das von ihm mit weiteren Funktionen und Verbesserungen versehene Programm *Dermheat*.

Schließlich danke ich dem gesamten MIDIS-Team für die Bereitschaft, einem Physiker biologische Sachverhalte näherzubringen. Dies sind, soweit nicht bereits genannt: Dr. A. Rück, Prof. Dr. M. Schneider, Dr. H. Hug, Dipl.-Biol. N. Akgün und D. Dayanakli.

A. Anhang

A.1. Kurzbeschreibung des Programms *Megauss*

Das in dieser Arbeit um wichtige Funktionen erweiterte Programm *Megauss* dient der Berechnung von Amplituden- und Phasenprofilen in Laserresonatoren (Abb. A.1).

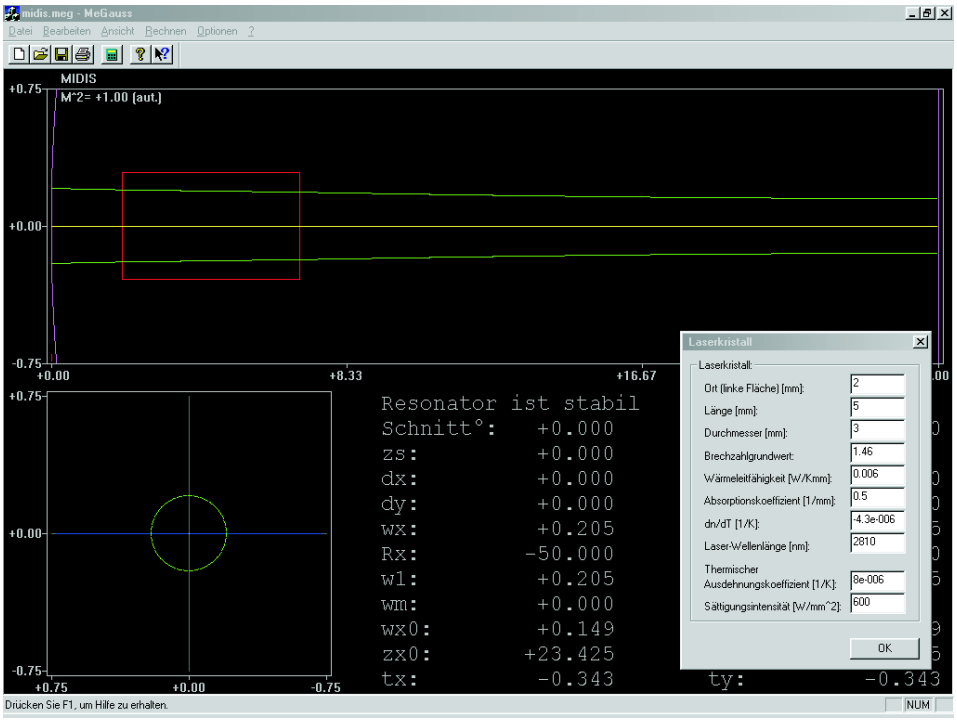


Abb. A.1.: *Bildschirmansicht von Megauss 2.0. Rechts unten ist beispielhaft das Eingabefenster für die Kristalldaten gezeigt.*

Damit können wesentliche Aussagen zu Resonatorstabilität und Strahlgeometrie des Grundmodes gemacht werden, wodurch entsprechende Experimente zielgerichteter durchgeführt werden können. Speziell für den Fall endgepumpter Festkörperlaser werden die im Laserkristall auftretenden thermischen Linseneffekte und temperaturbedingte Endflächendeformationen berücksichtigt. Weiterhin lassen sich Verkippungen von optischen Elementen und der Einsatz astigmatischer Optiken simulieren.

Die Erweiterungen betreffen u.a. die näherungsweise Berücksichtigung höherer Moden und damit eine Voraussage des M^2-Werts, Berechnungen zu optimalem Auskoppelgrad und erwartete Ausgangsleistung, sowie eine komfortable Bedienoberfläche, in die auch eine Hilfefunktion integriert ist.

A.2. Diodenspektren und Temperaturabhängigkeit

Die Emissionswellenlänge von Laserdioden ist temperaturabhängig. Dies ist für die Laserdiode DLC-500-980 der Firma AOC (USA) in den Abbildungen A.2 und A.3 dargestellt. Die Messungen erfolgten mit dem Spektrometer SpektraPro SP150 der Firma Acton Research Corp. (USA).

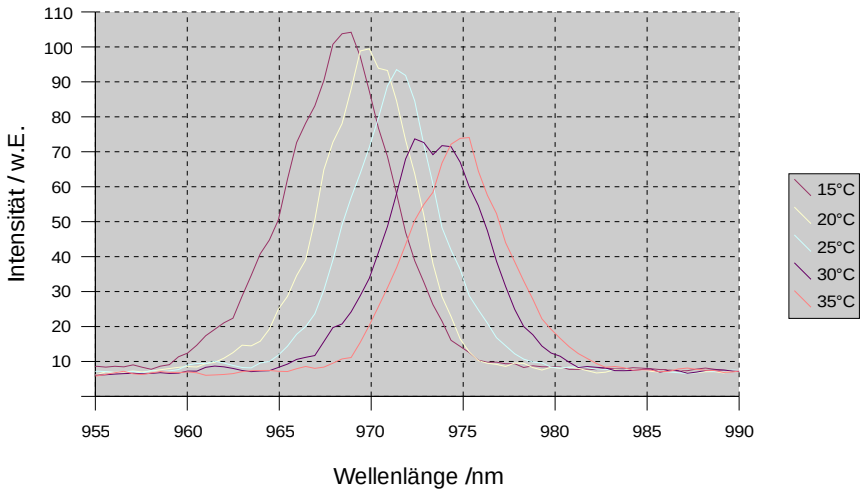


Abb. A.2.: *Spektren bei verschiedenen Temperaturen (Betriebsstrom 1039 mA)*

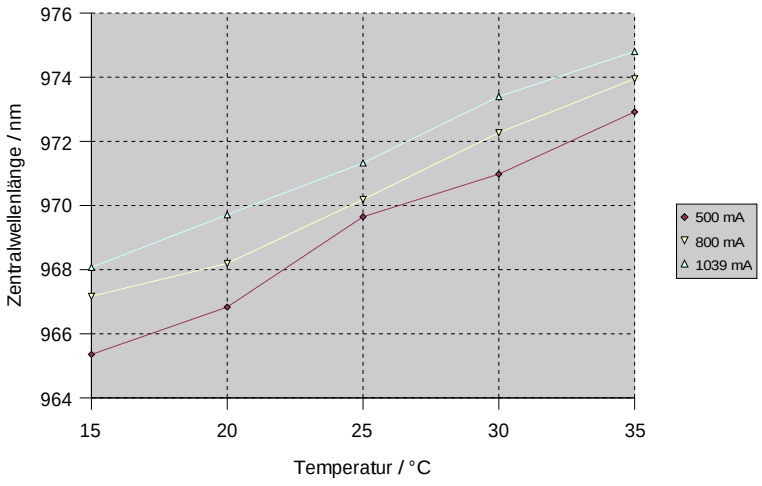


Abb. A.3.: *Abhängigkeit der Zentralwellenlänge von Temperatur und Betriebsstrom*

A.3. Aufbau und Schaltung der Pumpeinheit

Um die Wellenlänge der Pumpdiode konstant zu halten, wird deren Temperatur mit thermoelektrischen Kühlern geregelt. Die TE-Kühler sind ihrerseits aktiv luftgekühlt. Eine Schemazeichnung des gesamten Aufbaus inklusive der elektrischen Verkabelung der Pumpeinheit zeigt Abb. A.4.

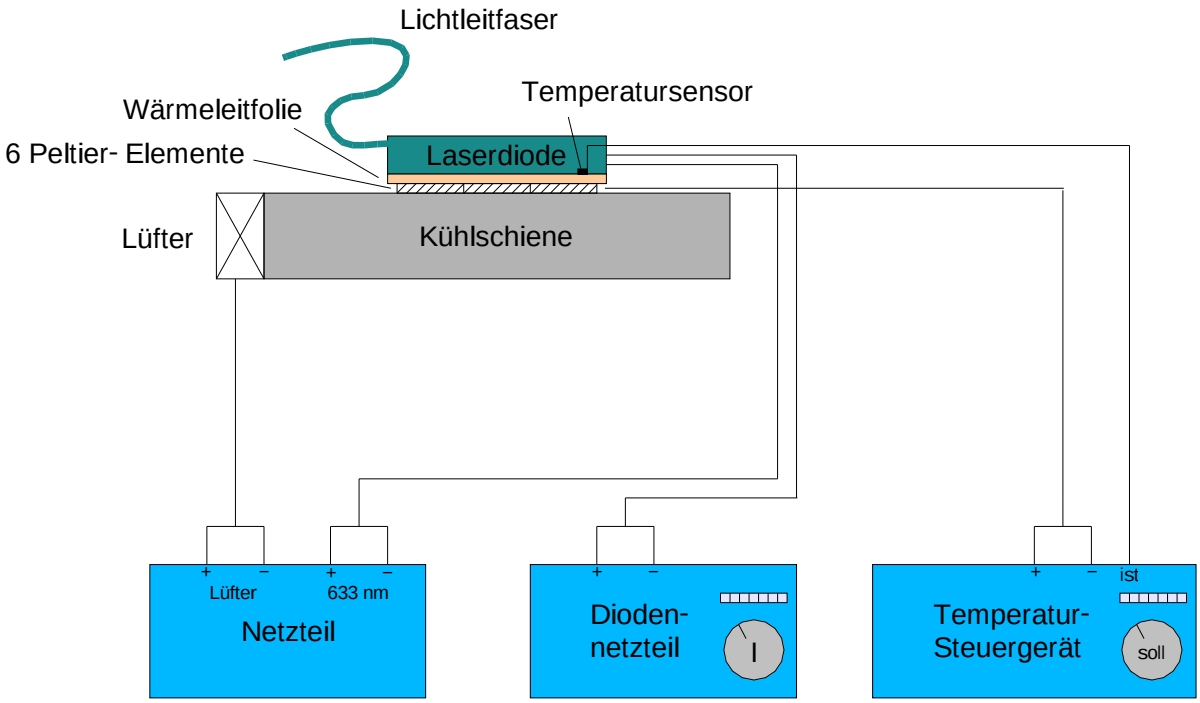


Abb. A.4.: *Skizze zu Aufbau und Schaltung der Pumpeinheit (die genauen Anschlussdaten sind den jeweiligen Datenblättern zu entnehmen)*

A.4. Untersuchung alternativer Laserkristalle

In einer Kooperation mit dem Vavilov State Optical Institute (GOI) in St. Petersburg wurden alternative Kristallmaterialien untersucht. Die Abb. A.5 zeigt hierzu erste Ergebnisse. Die Kristalle wurden mit der Laserdiode OPC-B015-968-FC der Firma Opto Power Corp. (USA) bei drei verschiedenen Betriebsmodi gepumpt (gepulst bei zwei verschiedenen Leistungen und cw). Bei den Er:BYF-Kristallen kam außerdem die High-Brightness-Diode DLC-500-980-3-MM der Firma AOC (Applied Optronics Corp., USA) zum Einsatz. Der Laseraufbau entspricht der Abb. 6.1, allerdings mit planem Endspiegel und konkavem Auskoppler.

Die Messungen mit einem von der Firma HAM (Schwendi-Hörenhausen) stammenden Er:YLF-Kristall dienen dem Vergleich.

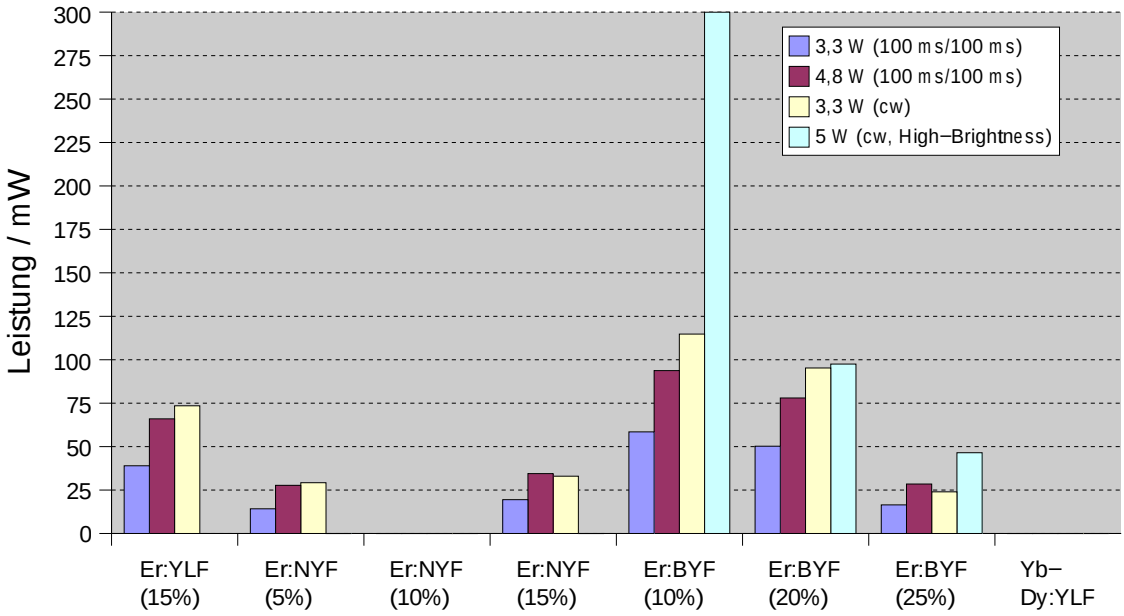


Abb. A.5.: *Vergleich der Effizienz verschiedener Kristallmaterialien*

Mit Er:BYF konnte gegenüber Er:YLF eine deutliche Effizienzsteigerung festgestellt werden. Dass dies für Er:NYF[1] nicht zutrifft, liegt möglicherweise an Kristallverunreinigungen, die im Falle von Er:NYF (10%) mit bloßem Auge sichtbar waren und bedarf weiterer Aufklärung. Bei Yb-Dy:YLF (10%-1,5%) schließlich konnte bislang kein Laserbetrieb nachgewiesen werden.

[1] Er:$Na_2Y_3F_{11}$

A.5. Justagekonzepte

A.5.1. Laser

Die Justage des Lasers erfolgt mit Hilfe eines He-Ne-Lasers, im Wesentlichen über Reflexionen, die auf einem am Justagelaser angebrachten Blatt sichtbar werden (Abb. A.6).

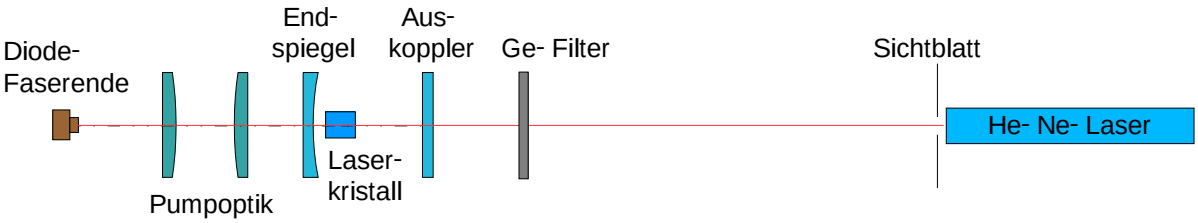


Abb. A.6.: *Skizze zur Justage des Lasers*

Die folgende Arbeitsanweisung beschreibt die einzelnen Justageschritte:

1. Grobe Ausrichtung des Justagelasers auf die optische Achse unter Verwendung zweier Pinholes.
2. Genaue Ausrichtung des Justagelasers auf den Laserkristall, der mittig getroffen werden und dessen Endflächenreflex in den He-Ne-Strahl zurückgeworfen werden sollte.
3. Grobe Justage des konkaven Endspiegels über den diffusen Reflex auf dem Sichtblatt.
4. Laterale Justage der Pumpoptik: Der He-Ne-Strahl sollte mittig auf die Faserendfläche treffen. Grobe axiale Justage gemäß der bekannten Brennweiten.
5. Inbetriebnahme der Diode. Einstellung der Temperatur nach Abb. A.3 auf eine Emissionswellenlänge von 972 nm. Genauere axiale Justage der Pumpoptik während Betrieb der Diode: Erzeugung eines möglichst schmalen Pumpkanals im Laserkristall. Dieser ist aufgrund der grünen Fluoreszenz sichtbar. Achtung: Schutzbrille für 972 nm!
6. Einsetzen des planen Auskopplers und Justage mittels Reflex.
7. Einsetzen des Germaniumfilters und eines Leistungsmessgeräts.
8. Justage des Endspiegels und der genauen axialen Lage der Pumpoptik auf maximale Ausgangsleistung.

A.5.2. Fokussierung

Die laterale Justage des Reflexionsobjektivs erfolgt am besten über eine Thermo-Kristallfolie, die Temperaturerhöhungen farbig sichtbar macht. Bei korrekter Justage zeigt diese, direkt hinter das Reflexionsobjektiv gehalten, eine Wärmeverteilung, wie sie in Abb. A.7 dargestellt ist. Sie ergibt sich durch den Schattenwurf des kleinen Spiegels. Im Gegensatz zur Nachbildung dieses Sachverhalts in Abb. 6.6 werfen hier auch die den Spiegel haltenden Stege Schatten, so dass typischerweise statt eines Rings drei nierenförmige Wärmegebiete sichtbar werden. Eine korrekte Justage des Reflexionsobjektivs ist dann gegeben, wenn das Farbmuster sich nach Einschalten des Lasers symmetrisch ausbildet.

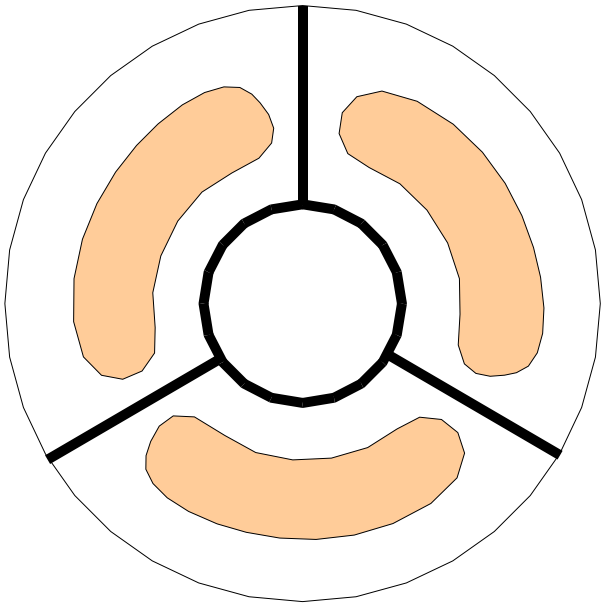


Abb. A.7.: *Skizze zur Justage des Reflexionsobjektivs*

Literaturverzeichnis

[1] L. Bergmann and C. Schaefer. *Lehrbuch der Experimentalphysik, Bd. 3. Optik*. Walter de Gruyter & Co., 1978.

[2] D.-W. Chen, C. L. Fincher, T. S. Rose, F. L. Vernon, and R. A. Fields. Diode-pumped 1-W continuous-wave Er:YAG 3-µm laser. *Opt. Lett.*, 24(6):385–387, 1999.

[3] M. Edelmann. Berechnung von Amplituden- und Phasenprofilen von Festkörperlasern unter Berücksichtigung von Polarisation und Frequenzverdopplung. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 1995.

[4] M. R. Emmert-Buck, R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, and L. A. Liotta. Laser Capture Microdissection. *Science*, 274:998–1000, 1996.

[5] R. E. Ferrando, S. T. Schuschereba, J. A. Quong, and P.D. Bowman. Carbon dioxide laser induction of heat shock protein 70 synthesis: Comparison with high temperature treatment. *Lasers in Med. Sci.*, 10(3):207–212, 1995.

[6] A. Giesen, H. Hügel, A. Voss, K. Wittig, U. Brauch, and H. Opower. Scalable Concept for Diode-Pumped High-Power Solid-State Lasers. *Appl. Phys. B*, 58:365–372, 1994.

[7] K. O. Greulich. *Micromanipulation by light in biology and medicine: the laser microbeam and optical tweezers*. Birkhäuser, 1999.

[8] N. Gutknecht, S. Kanehl, A. Moritz, C. Mittermayer, and F. Lampert. Effects of Nd:YAG-laser irradiation on monolayer cell cultures. *Lasers Surg Med*, 22(1):30–36, 1998.

[9] J. Hecht. *The Laser Guidebook*. McGraw-Hill Book Company, 1986.

[10] R. Hibst. *Technik, Wirkungsweise und medizinische Anwendungen von Holmium- und Erbium-Lasern*. ecomed Verlagsgesellschaft, 1997.

[11] G. Huber, E.W. Duczynski, P. Mitzscherlich, H.O. Teichmann, and D. Lumma. Room-temperature 2-µm Ho:YAG and 3-µm Er:YAG Lasers. *J. de Physique*, 48:347, 1987.

[12] M. E. Innocenci, H. T. Yura, C. L. Fincher, and R. A. Fields. Thermal modeling of continuous-wave end-pumped solid-state lasers. *Appl. Phys. Lett.*, 56(19):1831–1833, 1990.

[13] T. Jensen. *Upconversion-Prozesse und Wirkungsquerschnitte in Er^{3+}-dotierten 3 µm Fluorid- und Granat-Lasern, gepumpt mit cw und quasi-cw Dioden-Arrays*. Dissertation, Universität Hamburg, 1996.

[14] F. H. Johnson, H. Eyring, and B. J. Stover. *The Theory of Rate Processes In Biology and Medicine*. Wiley, 1974.

[15] G. J. Kintz, R. Allen, and L. Esterowitz. Cw and pulsed 2.8 µm laseremission from diode-pumped $Er^{3+} : LiYF_4$ at room temperature. *Appl. Phys. Lett.*, 50:1553, 1987.

[16] H. Kleinig, P. Sitte, and U. Maier. *Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag, 1999.

[17] W. Koechner. *Solid-State Laser Engineering*. Springer-Verlag, 1988.

[18] P. Laporta and M. Brussard. Design Criteria for Mode Size Optimization in Diode-Pumped Solid-State Lasers. *IEEE J. Quant. Electr.*, 27:2319–2326, 1991.

[19] Y. Liu, D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, and B. J. Tromberg. Microfluorometric technique for the determination of localized heating in organic particles. *Appl. Phys. Lett.*, 65(7):919–921, 1994.

[20] M. H. Niemz. *Laser-Tissue-Interactions*. Springer, 1996.

[21] T. Parasassi, G. De Stasio, A. Dubaldo, and E. Gratton. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by laurdran fluorescence. *Biophysical Journal*, 57(6):1179–1186, 1990.

[22] M. S. Patterson, B. C. Wilson, and D. R. Wyman. The propagation of optical radiation in tissue ii. *Lasers in Medical Science*, 6:379–390, 1991.

[23] A. Roggan. *Dosimetrie thermischer Laseranwendungen in der Medizin*. ecomed, 1997.

[24] B. Romeis. *Mikroskopische Technik*. Urban u. Schwarzenberg, 1989.

[25] Saphikon. Properties and benefits of sapphire: A quick reference guide. Technical report.

[26] Schott. Optisches Glas. Technical report, Schott-Glaswerke GmbH, 1992.

[27] K. Schütze, I. Becker, K.-F. Becker, S. Thalhammer, R. Stark, W. M. Heckl, M. Böhm, and H. Pösl. Cut out or poke in - the key to the world of single genes: laser micromanipulation as a valuable tool on the look-out for the origin of disease. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 14:1–8, 1997.

[28] A. E. Siegman. *Lasers*. Oxford University Press, 1986.

[29] B. Srinivasan, J. Tafoya, and R. K. Jain. High-power „Watt-level“ CW operation of diode-pumped 2.7 µm fiber lasers using efficient cross-relaxation and energy transfer mechanisms. *Optics Express*, 4(12):490–495, 1999.

[30] K. Vilpoux. Experimente zum Kultivieren von Zellen auf PEN-Folie. Mündliche Mitteilung.

[31] R. C. Weast. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press Inc., 1987.

[32] V. M. Zolotarev, B. A. Mikhailov, L. I. Alperovich, and S. L. Popov. Dispersion and absorption of liquid water in the infrared and radio regions of the spectrum. *Opt. Spectros.*, 27:430–432, 1969.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Wasser-Absorptionsspektrum 6

3.1. Modell ohne Ablation 12
3.2. Modell mit Ablation 13
3.3. cw-Ergebnisse 18
3.4. Temperaturverteilung nach 2 ms 19
3.5. Puls 1 ms - Ergebnisse 19
3.6. Puls 100 µs - Ergebnisse 20
3.7. Puls 10 µs - Ergebnisse 20
3.8. cw- Ergebnisse „von unten“ 21
3.9. Temperaturverteilung nach 2 ms bei Bestrahlung von unten 21
3.10. Ergebnisse inkl. Ablation 22
3.11. Temperaturverteilung nach 1 ms unter Berücksichtigung der Ablation 23

4.1. Energieniveauschema von Er:YLF 26
4.2. Endgepumpter Laserkristall 28
4.3. Scheibenlaser-Prinzip 28

5.1. TEM_{00}-Mode bei einem konkaven Auskoppler 32

5.2. TEM_{00}-Mode bei einem planen Auskoppler 33

5.3. Endspiegel mit Krümmung 50 mm 33

5.4. Endspiegel mit Krümmung 250 mm 34

5.5. Ablage des Laserstrahls von der optischen Achse 34

5.6. Einfluss der Resonatorlänge auf die Transversalmoden 35

6.1. Experimentalaufbau des endgepumpten Er:YLF-Lasers 38

6.2. Aufnahmen des entwickelten Infrarot-Lasers 39

6.3. Reflexionsobjektiv 25-0514 42

6.4. OSLO-Nachbildung des x25-Reflexionsobjektivs 43

6.5. Spotdiagramm im Fokus 44

6.6. Spotdiagramm direkt hinter dem kleinen Spiegel 44

6.7. Transmission durch das Reflexionsobjektiv 45

6.8. Ausgangsleistung des Lasers 47

6.9. Leistungsverlauf in den ersten 9 s 48

6.10. Leistungsverlauf mit hoher Zeitauflösung 48

6.11. Typisches Spiking 49

6.12. Knife-Edge-Methode 50

6.13. Strahlprofil in zwei verschiedenen Abständen vom Auskoppler 52

6.14. Fokusprofil bei Verwendung des x36-Objektivs 53

7.1. Gesamtsystem mit eingekoppeltem IR-Laser 54

7.2. Aufnahme von C6-Zellen bei 40-facher Vergrößerung 56

7.3. Strahlverläufe von Laserstrahl und Fluoreszenz 57

8.1. Für den Arrheniusformalismus vorausgesetzte Reaktionskinetik 61

8.2. Anordnung für Koagulationsmessungen 63
8.3. Koagulationspunkte bei unterschiedlichen Bestrahlungsdauern 64
8.4. Temperaturverläufe in verschiedenen Abständen zum Zentrum der Bestrahlung 65
8.5. Räumliche Temperaturverteilung nach 1 s 65
8.6. Temperaturverteilung nach 1 s im Vergleich zum Experiment 66
8.7. Verläufe der Schädigungsintegrale in verschiedenen Abständen zum Zentrum 66
8.8. Vergleich zwischen gemessenen Koagulationsradien mit der Simulation . . . 68

9.1. Schädigungszonen in einem Monolayer von C6-Zellen (P=48 mW) 70
9.2. Schädigungszonen in einem Monolayer von C6-Zellen (P=18 mW) 70
9.3. Radien der Schädigungszonen im Vergleich zur Simulation 71
9.4. Sandwichanordnung zum Schneiden von Zell-Schichten 73
9.5. Gelunterstützter Schnitt einer PEN-Folie 74
9.6. Schnittspur in Zwiebel-Epidermiszellen 75
9.7. Histologie eines Schnitts mit dem IR-Laser 75
9.8. Histologie eines Schnitts mit dem CO_2-Laser 75

A.1. Bildschirmansicht von Megauss 2.0 80
A.2. Spektren der Laserdiode AOC-DLC-500-980 82
A.3. Abhängigkeit der Zentralwellenlänge von Temperatur und Betriebsstrom . . . 82
A.4. Aufbau und Schaltung der Pumpeinheit 83
A.5. Vergleich der Effizienz verschiedener Kristallmaterialien 84
A.6. Justage des Lasers 85
A.7. Justage des Reflexionsobjektivs 86

Tabellenverzeichnis

3.1. Modellparameter 14

5.1. Materialdaten zu Er:YLF 31

6.1. Spezifizierte Parameter des Coherent-Objektivs 25-0514 42

Index

Abbildungsfehler, 40
Abbildungsqualität, 43
Abblendung, 44
Ablation, 10, 12, 22
Absorption, 14, 15
Agarose, 73
Airy-Scheibchen, 43
Aktivierungsenergie, 60
Albumin, 63
Alium cepa, 74
AMD, 5
Apertur
    numerische, 40
Apoptose, 9
Arrhenius-Formalismus, 60
Arrheniusparameter, 60, 62, 67, 69
Auskoppelgrad, 40
Auskoppler, 40, 55
Austrocknung, 72
Axikon, 46
Azanfärbung, 76

BeamMap, 51
Bestrahlung
    von oben, 18
    von unten, 17, 21
Beugungsbegrenzung, 24
Beugungsgrenze, 43
Bildqualität, 55
Biochip, 5
BK7, 13

Caspasen, 9
Cassegrain-Prinzip, 41
Chromatische Aberation, 41
CO_2-Laser, 76
Coherent, 41

Denaturierung, 63
Dermheat, 11
Doppelreflexion, 44
Dotierung, 27

Eindringtiefe, 6, 76
Einkopplung, 54
Eiweiß, 63
Endpumpen, 27
Endspiegel, 33, 40
Entropie, 61
Experimentalaufbau, 38

Farbverfälschung, 55
Faserlaser, 29
Finite-Differenzen-Rechnung, 11, 64
Fluoreszenz, 57
Fluoreszenzspektrum, 59
Fokusdurchmesser, 40, 44
Fokussierbarkeit, 76
Fokussierlinse, 55

Fokussiermethoden, 41
Fokussieroptik, 40
Fokussierung, 24, 40, 52
    Pumpstrahlung, 31

g-Faktor, 16
Güteschaltung, 24
Gauß-Strahl, 40
Gaußprofil, 45, 50
Gaußstrahl, 45
Gel, 73
Gen-Expression, 9
Germanium-Filter, 38, 58
Gesamtsystem, 54
Gewebe
    Absorption, 76
    Histologie, 75
    Schnitte in Leber, 75
Grundmode, 35, 52

He-Ne-Laser, 85
Heatshock, 9
High-Brightness-Dioden, 39
High-Throughput, 5
HSP, 9
Hyperthermie, 9

Infrasil, 41
ion-plating, 40
ion-sputtering, 40

Justage, 85
Justageanweisung, 85
Justagelaser, 85
Justierbarkeit, 33

Küchenzwiebel, 74

Kittglied, 41
Knife-Edge, 49
Koagulation, 63
Kollimation, 55
Krümmungsradien, 43
Kristallbruch, 27, 38

Laser
    Aktive Zone, 57
    Ausgangsleistung, 47
    Beschichtung, 39
    Betriebsmodi, 17
    cw-Betrieb, 26
    Divergenz, 51, 58
    Eigenschaften, 46
    Einstrahlrichtung, 17
    Endspiegel, 32
    Er:YAG, 24
    Fokus, 57
    Gaußprofil, 63
    Justage, 85
    Pulsbetrieb, 24
    Spiegel, 31
    Spiking, 47
    Spitzenleistung, 24
    Strahlkaustik, 49
    Strahlparameter, 36
    Strahlqualität, 24
    Strahltaille, 32
    Theorie, 26
    Wellenlänge, 23
    Zeitliches Verhalten, 47
Laser-Auskoppler, 32
Laserdiode, 27, 31, 38, 39
    Faser, 39
    Numerische Apertur, 31, 39

Wellenlänge, 39
Laserdioden
Emissionsspektrum, 28
Kenngröße, 27
Laserkristalle, 29
alternative, 84
Er:BYF, 46
Er:YAG, 27
Er:YLF, 26–30, 38
Er:YSGG, 26, 29
Laserpinzette, 5
Laserscanning-Mikroskop, 5
Laserverfahren
diagnostisch, 5
therapeutisch, 5
Laurdan, 59

M^2-Faktor, 37
Materialkonstanten
Absorptionskoeffizient, 14
Brechzahl, 14
Dichte, 14
Spezifische Wärme, 14
Wärmeleitfähigkeit, 14
Materialparameter, 13
Matrix-Formalismus, 30, 36
Megauss, 30, 52
Mikrochirurgie, 76
Mikrodissektion, 5, 9
Mikrodissektions-System, 54
Mikroskop
Beobachtungs-Strahlengang, 55
Kondensor, 55, 56
Verschiebetisch, 55
Modell, 11
Parameter, 13
Multimode, 36
Mutagenität, 6

Nekrose, 8
Numerische Apertur, 25, 56, 58

Objektträger
Glas, 13
Optikdesign, 41, 42
Optiken
diffraktiv, 41
refraktiv, 41
OSLO-LT, 42

P.A.L.M., 10
Parameter
feste, 17
zu variierende, 17
PEN-Folie, 73
Schnitt, 73
pH-Wert, 67
Pinhole, 85
Proteindenaturierung, 61
Pumpdiode
Aufbau, 83
Spektren, 82
Temperaturabhängigkeit, 82
Pumpleistungsdichte, 26, 27

Rattentumorzellen, 69
Rayleighstreuung, 16
Reaktionskinetik, 60
Referenzpunkt, 72
Reflexion, 14
Reflexionsgrad, 40
Reflexionsobjektiv, 41, 42, 86
Remission, 14, 16

Resonatordesign, 30
Resonatorlänge, 35

Sandwichanordnung, 73
Saphir, 41
Schädigungsintegral, 62, 66
Schädigungszone, 69
Scheibenlaser, 28
Schicht
    wässrige, 72
Schichtporen, 40
Schneidversuche, 72
Schnittbreite, 73, 76
Schnitte
    Gewebe, 75
    Zwiebel, 74
Screening, 5
Shutter, 24
Stimulation, 6
Strahlführung, 54
Strahlradius, 45
Strahltaille, 55
Streuung, 14, 16

Temperatur
    kritische, 62, 67, 72
    Verteilung, 64
    Zeitlicher Verlauf, 64
Temperaturverläufe
    cw, 18, 21
    gepulst, 19
Temperaturverteilung, 7
    bei Saphir, 18, 21
Thermische Linse, 29, 64
Thermofolie, 86
Tophat-Profil, 12, 24, 51
Trägermaterialien, 17
Transmission, 14, 15, 44, 45
Trypanblau, 69

Umlenkspiegel, 55
Upconversion, 26, 57
Upconversion-Laser, 57
UV-Strahlung, 6

Verluste, 40
Videokamera, 55

Wärmestrahlung, 59
Wasser
    Absorption, 6
Wechselwirkungsmechanismen, 14

Zellen
    C6, 69
    Einzelzelle, 7
    Monolayer, 6, 69
    Schädigung, 69
Zielstrahl, 41, 57
Zwiebel
    Epidermiszellen, 74
    Wassergehalt, 74

Lebenslauf

Dipl.-Phys. Martin Edelmann

geb. 30.12.1967 in Aalen

1974-1987	Grundschule und Gymnasium in Aalen (Leistungskurse Mathematik und Musik).
1987-1995	Physikstudium an der Universität Stuttgart mit Abschluss Diplom.
1988-1991	Paralleles Schulmusik-Studium an der Musikhochschule Stuttgart.
1994-1995	Diplomarbeit bei Carl Zeiss Oberkochen (Laserentwicklung). Interdisziplinäre Zusammenarbeit mit dem Institut für Strahlwerkzeuge (Dr. Giesen) und dem 2. physikalischen Institut (Prof. Dr. Paus) an der Universität Stuttgart. Mitwirkung an der Masterplanung für den Transfer der ophthalmologischen Laser von Oberkochen nach Jena.
1995-1997	Mitarbeiter der ophthalmologischen Laserentwicklung bei Carl Zeiss Jena. Projektleitung der Entwicklung und Serieneinführung des Koagulationslasers Visulas 532. Mehrere Patente. Förderung im Rahmen des Führungskräftenachwuchs-Programms der Firma Carl Zeiss.
1998-2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion am Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm.
Sprachen:	Englisch, Schwedisch.
Interessen:	Klassische Musik, erster Cellist in mehreren Orchestern, Erteilung von Cello- und Klavierunterricht, Astronomie, Informatik.

Aalen, 1. Mai 2001