

Center for Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy (CeMOS)
an der Hochschule Mannheim
Institutsdirektor: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Rädle

Entwicklung und Erprobung eines voxelbasierten Bildgebungsverfahrens für
dreidimensionale (3D) Tumor-Zellkulturen aus der Kombination von Raman-
und Fluoreszenzspektroskopie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Steffen Manser, M.Sc.

aus
Eberbach
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Rädle

*„Der Erfolg ist nicht danach zu beurteilen,
was ein Mensch im Leben erreicht,
sondern nach den Hindernissen,
die er auf dem Weg zum Erfolg überwunden hat.“*

Booker T. Washington (1856 – 1915)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Geschichte der Medizin	1
1.1.1 Dreidimensionale Zellkulturen	2
1.1.2 Darstellungsmethoden	4
1.1.3 Lichtscheibenmikroskopie	6
1.1.4 Fluoreszenz in Zellen	9
1.1.5 Der Raman-Effekt	13
1.1.6 Anwendung des Lichtscheiben-Raman-Mikroskops bei 3D-Zell- kulturen.	17
1.2 Bezug zur Problemstellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Grundlagen des technischen Aufbaus	19
2.2 Detaillierte Erklärung und Besonderheiten zentraler Komponenten	27
2.2.1 Laser	27
2.2.2 Probenkammer und Objektive	29
2.2.3 4D-Verfahreinheit	30
2.2.4 Akusto-optisch durchstimmbarer Filter.	31
2.2.5 Kamera	35
2.2.6 Spektrometer und Messbereiche der Laser	36
2.3 Probenauswahl und -präparation	38
2.4 Messmethodik und -modalitäten.	42
3 Ergebnisse	45
3.1 Technische Umsetzung des LSRM	45
3.1.1 Sicherheitsrelevante Maßnahmen	45
3.1.2 Aufbau des LSRM	47
3.1.3 Laserstabilität	49
3.1.4 Koaxiale Ausrichtung der Laserstrahlen	58
3.1.5 Lichtblattdimensionen	61
3.1.6 Verfahrengenauigkeit und Schrittweite der 4D-Verfahreinheit	67
3.1.7 Bandbreite und Wiederholgenauigkeit des AOTFs.	74
3.1.8 Bildfeldbestimmung und Auflösung der Kamera	80
3.1.9 Pixel-Stabilität	82
3.1.10 Spektrometerstabilität und Mindestsignalintensität	96
3.2 Software-Entwicklungen	97
3.2.1 Steuerung der Komponenten	97

	Seite
3.2.2	Bildbearbeitung 101
3.2.3	3D-Rekonstruktionssoftware. 105
3.3	Bildaufnahme verschiedener Modalitäten einer 3D-Zellkultur 107
3.3.1	Rayleigh-Konfiguration 107
3.3.2	Fluoreszenz-Konfiguration 109
3.3.3	Plausibilitätsmessung 112
3.3.4	Raman-Konfiguration 116
3.4	Darstellung der Resultate im 3D-Modell 119
3.5	Vergleich der Raman-Messungen mit Referenz-Gerät 125
4	Diskussion 131
4.1	Technische Bewertung des LSRM 131
4.2	Beurteilung der Messergebnisse 138
4.3	Einsatzfähigkeit im Forschungslabor und im klinischen Umfeld 143
4.4	Schlussfolgerung 144
4.5	Ausblick 144
5	Zusammenfassung 147
6	Literaturverzeichnis 149
7	Lebenslauf 163
8	Danksagung 166

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation widmet sich der Forschungsarbeit im Bereich der Lichtscheiben-Raman-Mikroskopie. Mit dieser Arbeit werden Fortschritte und neue Erkenntnisse angestrebt, die das Verständnis von 3D-Zellkulturen erweitern und zur Lösung herausfordernder Fragestellungen beitragen sollen. Die vorliegende Einleitung bildet den Auftakt zu dieser wissenschaftlichen Arbeit und stellt einen Überblick über die Ziele, den Forschungsstand, die Methodik und die Struktur der Dissertation dar. In den folgenden Kapiteln werden detaillierte Analysen, Experimente und Interpretationen präsentiert, die auf einer gründlichen Literaturrecherche, sorgfältigen Datenerhebungen und einer systematischen Untersuchung basieren. Diese Dissertation möchte somit einen substanziellen Beitrag zur aktuellen Forschungslage auf dem Gebiet der Medizintechnik bieten und weist auf Potenziale hin, zukünftige Entwicklungen und Anwendungen zu beeinflussen.

1.1 Geschichte der Medizin

Die Geschichte der Medizin ist eine Reise, die sich über Jahrtausende erstreckt und von bedeutenden Entdeckungen, Fortschritten und Innovationen geprägt ist.¹⁻³ Von den frühesten Aufzeichnungen über medizinische Praktiken bis hin zu den neuesten Errungenschaften wie dreidimensionalen Zellkulturen hat sich die Medizin ständig weiterentwickelt, um das Verständnis des menschlichen Körpers zu vertiefen und die Gesundheit und Lebensqualität der Menschen zu verbessern.

Die Anfänge der Medizin reichen weit zurück in die prähistorische Zeit, wo natürliche Heilmittel und magische Rituale zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt wurden. Die ältesten schriftlichen Aufzeichnungen über medizinische Praktiken stammen aus dem alten Ägypten und dem Mesopotamien des 4. Jahrtausends v. Chr.⁴ Die Ägypter entwickelten fortgeschrittene Kenntnisse über Anatomie und Behandlungsmethoden und hinterließen umfangreiche medizinische Papyri wie den Edwin-Smith-Papyrus und den Ebers-Papyrus.^{5,6} Mit dem Aufkommen weiterer Zivilisationen wie dem antiken Griechenland, dem Römischen Reich und dem alten Indien begannen sich medizinische Kenntnisse und Praktiken weiterzuentwickeln. Im antiken Griechenland entstand die hippokratische Medizin, die auf dem Konzept der Vier-Säfte-Lehre basierte und die Grundlage für viele spätere medizinische Traditionen bildete.^{7,8} In Indien wurden medizinische Schriften wie die Charaka-Samhita und die Sushruta-Samhita verfasst, die ein umfangreiches Wissen über Diagnose, Therapie und Chirurgie enthielten.^{9,10}

Während des Mittelalters wurden die Fortschritte in der Medizin größtenteils von arabischen Gelehrten wie Avicenna und Rhazes vorangetrieben.^{11,12} Sie übersetzten und erweiterten das medizinische Wissen der Antike und führten neue Konzepte wie die Anatomie ein.¹³ Im Laufe des Mittelalters wurden diese Ideen nach Europa übertragen und trugen zur Entwicklung der

medizinischen Praktiken und Institutionen bei. Die Renaissance brachte einen enormen Fortschritt in der Medizin mit sich. Im 16. und 17. Jahrhundert leisteten Persönlichkeiten wie Andreas Vesalius und William Harvey bahnbrechende Arbeit auf dem Gebiet der Anatomie und der Kreislaufphysiologie.¹⁴ Vesalius' Werk „De humani corporis fabrica“ revolutionierte das Verständnis der menschlichen Anatomie durch genaue Beobachtungen und detaillierte Illustrationen.^{15,16} Harvey entdeckte die Grundlagen des Blutkreislaufs und legte damit den Grundstein für das Verständnis der Herz-Kreislauf-Erkrankungen.¹⁷⁻¹⁹

Das 19. Jahrhundert war eine Ära großer Fortschritte in der Medizin. Die Entdeckung von Impfungen durch Edward Jenner zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie Pocken war ein Meilenstein.²⁰ Louis Pasteur trug zur Entwicklung der Mikrobiologie bei und entwickelte die Grundlagen der modernen Immunologie.^{21,22} Durch die Einführung der Anästhesie ermöglichte schmerzfreie Operationen,^{23,24} während die Einführung von antiseptischen Methoden durch Joseph Lister die Sterblichkeitsrate bei chirurgischen Eingriffen drastisch senkte.^{25,26} Im 20. Jahrhundert brachte die Medizin eine Vielzahl von Durchbrüchen hervor. Penicillin, von Alexander Fleming isoliert, revolutionierte die Behandlung von bakteriellen Infektionen und markierte den Beginn des Zeitalters der Antibiotika.^{27,28} Die Fortschritte in der Röntgentechnologie ermöglichte Einblicke in den Körper ohne chirurgische Eingriffe.²⁹ James Watson und Francis Crick legten mit ihrer Entdeckung der DNA-Struktur den Grundstein für das Verständnis der Genetik und ebneten den Weg zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms.³⁰⁻³²

In den letzten Jahrzehnten hat die Medizin enorme Fortschritte im Bereich der regenerativen Medizin und Gewebetechnik gemacht.³³ Durch die Einführung von dreidimensionalen (3D) Zellkulturen, auch als Organoide bekannt, können Forscher nun menschliche Gewebe und Organe im Labor nachbilden und detaillierter untersuchen.³⁴⁻³⁶ Durch die Kultivierung von Zellen in einem dreidimensionalen Kontext können Forscher komplexe Zell-Zell-Interaktionen, Gewebeentwicklung und Krankheitsmodellierung untersuchen.³⁷⁻³⁹ Zudem ermöglichen 3D-Zellkulturen die Entwicklung von individualisierten Therapien, indem sie es Forschern ermöglichen, auf spezifische Merkmale und genetische Variationen einzelner Patienten einzugehen.⁴⁰⁻⁴²

1.1.1 Dreidimensionale Zellkulturen

In der Disziplin der zellbiologischen Forschung hat sich die Anwendung von zweidimensionalen (2D) Zellkulturen als etablierte und fortlaufend akzeptierte Methode bewährt.^{43,44} Trotz ihres langjährigen Einsatzes gewinnt die Verwendung von 3D-Zellkulturen in jüngster Zeit zunehmend an Bedeutung, wie beispielsweise bei der Wirkstoffentwicklung in der medizinischen Forschung.^{45,46} Dieses gesteigerte Interesse basiert auf der Erkenntnis, dass 3D-Zellkulturen neue Möglichkeiten bieten, die natürlichen Gegebenheiten des Gewebes

besser nachzubilden und dadurch zu einer verbesserten Erkenntnisgewinnung beizutragen.⁴⁷ Abbildung 1 illustriert eine schematische Darstellung, die die Unterschiede zwischen verschiedenen Zellkulturen verdeutlicht. Diese Darstellung zeigt die strukturellen Merkmale und Anordnungen der Zellen in den verschiedenen Kultursystemen.

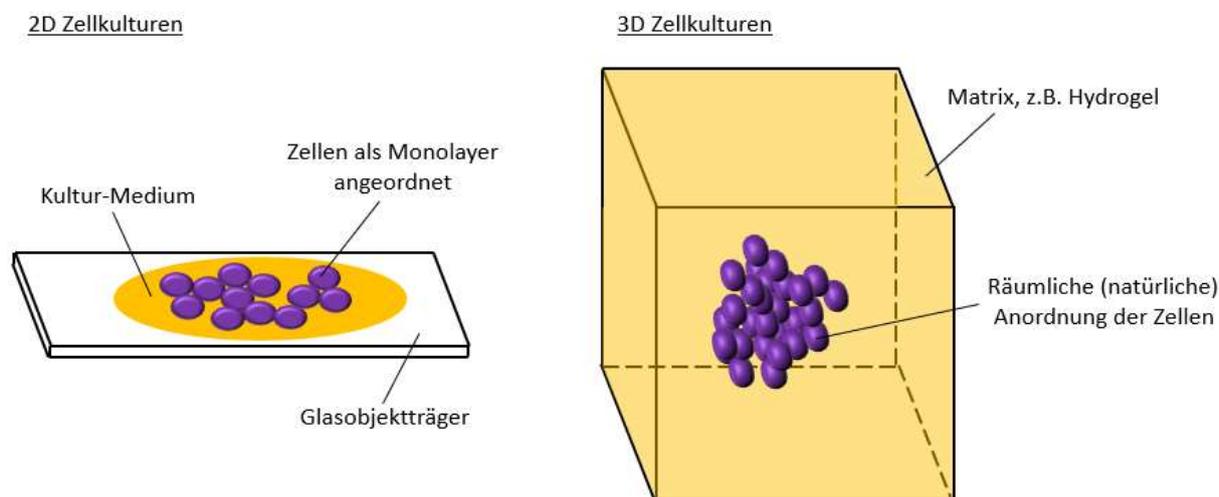


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Zellkulturen.

Der Unterschied zwischen traditionellen 2D- und neuartigen 3D-Zellkulturen liegt in ihrer Struktur, Funktion und Anwendungsbereiche. 2D-Zellkulturen bestehen aus einem Monolayer (einer einzelnen Schicht von Zellen), die auf einer flachen Oberfläche wie einer Petrischale oder einem Zellkulturplättchen angeordnet sind und in einer zweidimensionalen Umgebung aufwachsen. Diese Art der Kultivierung bietet eine kostengünstige, einfache Handhabung, eine gute Kontrolle über die Zellpopulation und ermöglichen die Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings.⁴⁸⁻⁵¹ Aufgrund dieser Eigenschaften werden 2D-Zellkulturen häufig für zellbasierte Assays, Toxizitätsstudien und die Untersuchung grundlegender zellulärer Prozesse eingesetzt. Allerdings können sie das komplexe Gewebemikromilieu nicht vollständig repräsentieren und bieten begrenzte Informationen über Zell-Zell-Interaktionen und Gewebeorganisation.^{42,49} 3D-Zellkulturen hingegen ahmen die natürliche dreidimensionale Umgebung von Geweben besser nach, was zu einer besseren Relevanz und Vorhersagbarkeit von Ergebnissen führen kann. Hier werden die Zellen in einer dreidimensionalen Matrix aus Hydrogelen, Kollagen, Fibrin oder anderen Materialien kultiviert, die ihnen eine räumliche Anordnung ermöglichen.⁵²⁻⁵⁴ Diese physikalische 3D-Struktur erlaubt es den Zellen, gewebeähnliche Strukturen zu bilden und komplexe zelluläre Prozesse wie Gewebeentwicklung und -architektur, Zellmigration und Zell-Zell-Interaktionen genauer zu untersuchen.³⁷⁻³⁹ 3D-Zellkulturen bieten eine physiologischere Umgebung, in der die Zellen ihre natürlichen Funktionen besser ausführen können. Dies ermöglicht beispielsweise die Untersuchung komplexer Krankheitsmodelle und die Entwicklung personalisierter Medizinansätze, indem auf die spezifischen Merkmale und genetischen Variationen einzelner Personen eingegangen

werden kann.⁴⁰⁻⁴² Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Unterschiede zwischen der traditionellen Methode von 2D-Zellkulturen im Vergleich zu den neuartigen 3D-Zellkulturen.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Zellkulturen anhand spezifischer Merkmale.^{51,55}

Merkmal	2D-Zellkulturen	3D-Zellkulturen
Definition	System, bei dem die Zellen auf einer künstlichen Oberfläche haften und wachsen	System, bei dem die Zellen in einer künstlichen Matrix suspendiert sind, die die Umgebung der Zelle nachahmt.
Zellanordnung	Einzelne Zellschicht (Monolayer)	Räumliche Anordnung von Zellen
Struktur	Zweidimensional	Dreidimensional
Gewebemikromilieu	Eingeschränkt repräsentativ	Bessere Nachbildung der Gewebeumgebung
Zell-Zell-Interaktionen	Begrenzt	Bessere Erfassung von Interaktionen
Gewebefunktion	Begrenzte Informationen	Detaillierte Einblicke
Wachstum	Schnelle Proliferation und Koloniebildung (Minuten bis Stunden)	Langsame Kulturbildung aufgrund physikalischer Beschränkung der Matrix
Anwendungsbereiche	Grundlegende zelluläre Studien	Regenerative Medizin, Krankheitsmodellierung, Arzneimittelentwicklung
Herstellung und Handhabung	Einfach	Erfordert spezielle Kenntnisse und Techniken
Standardisierung	Gut etabliert	Im Gange, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten

Obwohl 3D-Zellkulturen viele Vorteile bieten, gibt es auch Herausforderungen bei ihrer Anwendung. Die Herstellung und Handhabung von 3D-Kulturen erfordern spezielle Kenntnisse und fortschrittliche Techniken. Die Standardisierung von 3D-Kulturen ist noch im Gange, um Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu gewährleisten.^{56,57} Darüber hinaus sind weitere Fortschritte in der Entwicklung von geeigneten Matrix-materialien und Imaging-Techniken erforderlich, um das volle Potenzial von 3D-Zellkulturen auszuschöpfen.⁵⁸ Trotz dieser Herausforderungen bieten sowohl 2D- als auch 3D-Zellkulturen wertvolle Werkzeuge für die medizinische Forschung. Oft werden beide Ansätze kombiniert, um ein umfassenderes Verständnis der zellulären Prozesse zu erlangen.

1.1.2 Darstellungsmethoden

Für die Visualisierung und Analyse von 3D-Zellkulturen gibt es unterschiedliche Imaging-Techniken, die verwendet werden können. Die gängigsten Methoden sind:

1. Konfokale Mikroskopie⁵⁹: Die konfokale Mikroskopie ermöglicht eine detaillierte räumliche Darstellung von Zellen und Geweben. Sie basiert auf der Fokussierung eines Laserstrahls auf eine bestimmte Tiefe im Gewebe und erfasst das von den

fluoreszierenden Farbstoffen emittierte Licht. Durch die Aufnahme von Bildern in verschiedenen Tiefenebenen kann ein 3D-Bild des Gewebes rekonstruiert werden.

2. Mehrfachphotonen-Mikroskopie⁶⁰: Diese Technik verwendet einen Infrarotlaser, der hochenergetisches Licht erzeugt, um Gewebe zu durchdringen. Sie ermöglicht die hochauflösende Bildgebung von lebenden Zellen und Geweben in tieferen Schichten. Mehrfachphotonen-Mikroskopie eignet sich besonders gut für die Untersuchung von dreidimensionalen Zellstrukturen und dynamischen Prozessen in lebenden Geweben.
3. Optische Kohärenztomographie (OCT)⁶¹: OCT ist eine nichtinvasive Bildgebungstechnik, die auf dem Prinzip der Interferometrie basiert. Sie erzeugt Querschnittsbilder von Geweben, ähnlich wie bei der Ultraschallbildgebung, jedoch mit Licht anstelle von Schallwellen. OCT ermöglicht eine hochauflösende Darstellung von Gewebestrukturen und wird häufig in der Augenheilkunde eingesetzt.
4. Elektronenmikroskopie (EM)⁶²: Elektronenmikroskopie ermöglicht eine sehr hohe Auflösung und detaillierte Darstellung von Geweben auf der subzellulären Ebene. Es gibt zwei Hauptarten von Elektronenmikroskopie: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), bei der Elektronen durch eine dünne Gewebeprobe geschickt werden, und Rasterelektronenmikroskopie (SEM), bei der Elektronen über die Oberfläche einer Probe gerastert werden. EM eignet sich gut für die Untersuchung von Gewebestrukturen und Zellorganellen in 3D.
5. Tomographiebasierte Bildgebung⁶³: Fortschritte in der Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) haben dazu geführt, dass 3D-Bilder von Geweben und Organen in lebenden Organismen erstellt werden können. Diese bildgebenden Verfahren ermöglichen eine nichtinvasive Darstellung von anatomischen Strukturen in hoher Auflösung und sind in der klinischen Diagnostik weit verbreitet.

Neben der unterschiedlichen Art der Anregung und der Detektion unterscheiden sich die einzelnen Imaging-Techniken auch in der Art der Bildaufnahme. Während bei den Methoden der konfokalen Mikroskopie, der Mehrfachphotonen-Mikroskopie und der OCT hauptsächlich mit Raster-Mustern gearbeitet wird und die Bildaufnahme sequenziell aus den einzelnen Messpunkten erstellt wird, wird bei der EM eine Probe mit einem Elektronenstrahl abgerastert und das Signal detektiert. Im Gegensatz dazu werden bei der tomographiebasierten Bildgebung komplette Bildebenen aus unterschiedlichen Bildwinkeln erzeugt und zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert. Diese Methode ermöglicht die Erfassung von Informationen über die räumliche Verteilung von Strukturen in der Probe. Hierbei wird eine Serie von 2D-Bildern aufgenommen. Durch die anschließende Rekonstruktion dieser Bildserie entsteht ein dreidimensionales Bild der Probe. Eine besondere Methode für die Erzeugung von Aufnahmen ganzer Bildebenen ist die Lichtscheibenmikroskopie.

1.1.3 Lichtscheibenmikroskopie

Die Lichtscheibenmikroskopie, auch bekannt als Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM) oder Single Plane Illumination Microscopy (SPIM), ist eine fortschrittliche bildgebende Technik, die in der biologischen Forschung weit verbreitet ist.⁶⁴ Sie ermöglicht die Untersuchung lebender Proben mit hoher räumlicher Auflösung und geringer phototoxischer Wirkung.^{65,66} Das grundlegende Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie, dargestellt in Abbildung 2, besteht darin, die Probe mit einem dünnen Blatt aus Licht zu beleuchten, während sie schrittweise durchleuchtet wird. Im Gegensatz zu konventionellen Mikroskopiertechniken, bei denen die gesamte Probe gleichzeitig beleuchtet wird, wird bei der Lichtscheibenmikroskopie nur die Ebene in Fokus beleuchtet.

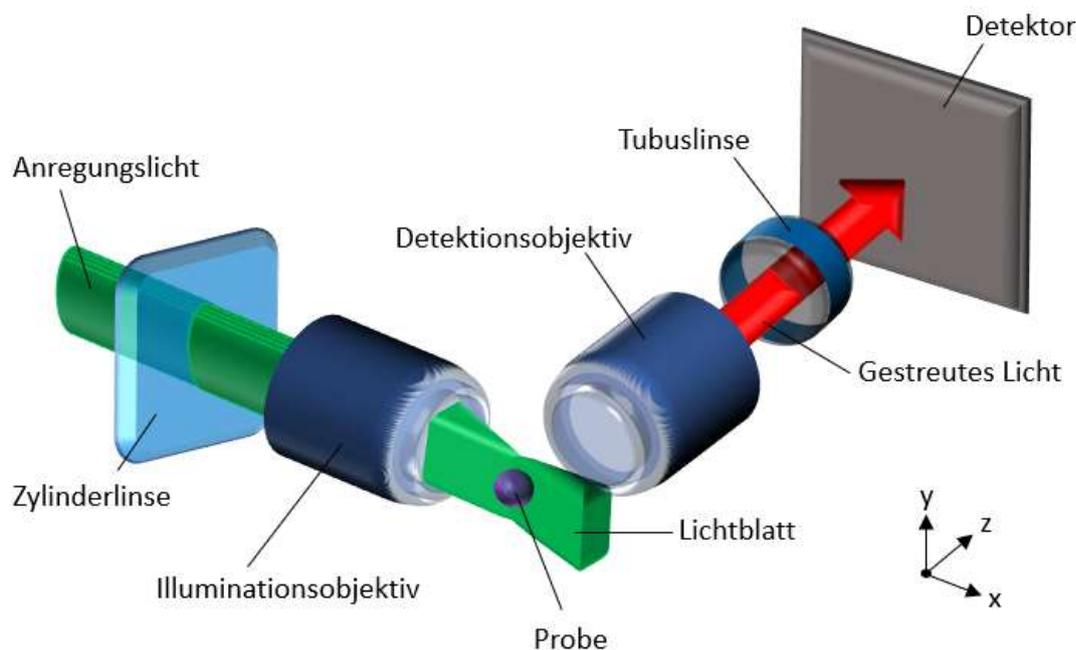


Abbildung 2: Schematische Darstellung des grundlegenden Prinzips der Lichtscheibenmikroskopie.

Die Lichtscheibenmikroskopie basiert auf der Verwendung von zwei Objektiven: einem Illuminationsobjektiv und einem Detektionsobjektiv. Das Illuminationsobjektiv erzeugt eine dünne Lichtscheibe, die senkrecht zur optischen Achse der Probe steht. Das orthogonal dazu angeordnete Detektionsobjektiv erfasst das Messsignal der beleuchteten Schicht. Durch eine Tubuslinse wird das detektierte Bild auf einen Detektor übertragen. Durch die kontinuierliche Bewegung der Probe entlang der z-Achse und die schichtweise Beleuchtung und Erfassung kann ein hochauflösendes 3D-Bild der Probe rekonstruiert werden.

Ein wichtiger Vorteil der Lichtscheibenmikroskopie ist die hohe laterale und axiale Auflösung, die es ermöglicht, feinste Details in der Probe sichtbar zu machen.⁶⁵ Durch die selektive Beleuchtung und Detektion der Fokusebene wird das Auftreten von Streulicht minimiert und das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.⁶⁷ Dadurch können schwache Signale erfasst werden, ohne das umgebende Gewebe zu stark zu beeinträchtigen.⁶⁷ Die Lichtscheibenmikroskopie bietet prinzipiell auch die Möglichkeit, lebende Proben in Echtzeit zu beobachten.

Durch die schnelle Abtastung der Schichten können dynamische zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Zellmigration oder Gewebeentwicklung erfasst werden.⁶⁸ Da die Beleuchtung der Probe und die Erfassung des Signals voneinander getrennt ist, kann die Lichtscheibenmikroskopie auch bei lichtempfindlichen Proben angewendet werden, ohne sie zu schädigen.⁶⁹ Eine Auflistung der Vor- und Nachteile der Lichtscheibenmikroskopie ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der generellen Vor- und Nachteile der Lichtscheibenmikroskopie.⁶⁵⁻⁶⁸

Vorteile der Lichtscheibenmikroskopie	Nachteile der Lichtscheibenmikroskopie
Hohe laterale Auflösung	Notwendigkeit spezieller Ausrüstung
Geringe phototoxische Schäden	Komplexität der Datenanalyse
Schnelle Bildaufnahme	Begrenzte Eindringtiefe in das Gewebe
Geringe Photobleaching	Empfindlichkeit gegenüber Probenbewegungen
Geringe Lichtexposition der Probe	Mögliche Phototoxizität der verwendeten Farbstoffe
Echtzeit-Bildgebung möglich	Beschränkte Anwendungsbereiche
3D-Rekonstruktion von Proben möglich	

Insgesamt bietet die Lichtscheibenmikroskopie eine leistungsstarke und schonende Methode zur Untersuchung lebender Proben mit hoher Auflösung und geringer phototoxischer Wirkung.⁶⁷ Traditionell findet die Lichtscheibenmikroskopie in Kombination mit der Fluoreszenz-Mikroskopie Anwendung.⁶⁹

Die Berechnung der Parameter für Lichtscheiben in der Lichtscheibenmikroskopie hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter die Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle und die numerische Apertur (NA) des Illuminationsobjektivs. In Abbildung 3 sind die einzelnen geometrischen Parameter der Lichtscheibenmikroskopie dargestellt.

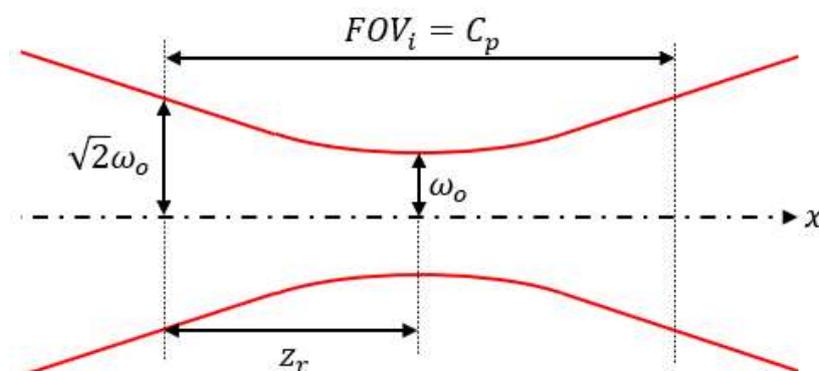


Abbildung 3: Übersicht über die geometrischen Parameter innerhalb eines Lichtblatts.⁷⁰

Der Lichtstrahl konvergiert zum Brennpunkt und divergiert anschließend. Das nutzbare Sichtfeld (Field of View – FOV_i) ist maßgeblich von dieser Konvergenz und Divergenz betroffen

und wird über den konfokalen Parameter C_p , auch Schärfentiefe genannt, angegeben.^{66,70} C_p gibt den Abstand zwischen zwei Punkten um die schmalste Taille ω_0 an, in dem die Tiefe des Lichtblatts auf $\sqrt{2}\omega_0$ zunimmt.⁷¹ Dieser berechnet sich nach:

$$FOV_i = C_p = 2 \cdot z_r = \frac{2\pi \cdot n \cdot \omega_0^2}{\lambda} \cong \frac{2 \cdot n \cdot \omega_0}{NA_i} \quad (1)$$

Hierbei ist z_r die Rayleigh-Länge, die die räumliche Ausdehnung eines Lichtstrahls im Raum beschreibt und ist definiert als Entfernung entlang der optischen Achse, über die die Querschnittsfläche um den Faktor $\sqrt{2}$ zunimmt. n gibt den Brechungsindex des Mediums an, in dem sich die Probe befindet, NA_i ist die numerische Apertur des Illuminationsobjektivs, λ die Wellenlänge der Beleuchtungsquelle. ω_0 gibt den Tailenradius am schmalsten Punkt des Lichtblatts an und wird wie folgt berechnet:

$$\omega_0 = \frac{n \cdot \lambda}{\pi \cdot NA_i} \quad (2)$$

Der Tailenradius ist demnach direkt von der NA des Illuminationsobjektivs als auch von der Wellenlänge der Beleuchtungsquelle abhängig.

Die axiale Auflösung des Lichtblatts R_{axial} lässt sich über folgende Formel bestimmen:

$$R_{axial} = 2 \cdot \omega_0 = 2 \cdot \frac{n \cdot \lambda}{\pi \cdot NA_i} = 2 \cdot \frac{2 \cdot \lambda \cdot f_i}{\pi \cdot D} \quad (3)$$

f_i ist die Brennweite des Illuminationsobjektivs, D gibt den Strahldurchmesser an.

Neben der Berechnung der Lichtblattdimensionen, die auf dem Illuminationsobjektiv beruhen, wird das Detektionsobjektiv und der Detektionspfad benötigt, um die finale Auflösung zu bestimmen. Zur Berechnung der finalen Vergrößerung M wird die Brennweite des Detektionsobjektivs f_d und die Brennweite der Tubuslinse f_{TL} benötigt.⁶⁶

$$M = \frac{f_{TL}}{f_d} \quad (4)$$

Die transversale Auflösung des Systems R_T wird bestimmt nach der Formel:

$$R_T = \frac{0,61 \cdot \lambda_{em}}{NA_d} \quad (5)$$

Hierbei ist λ_{em} die emittierte Wellenlänge und NA_d die numerische Apertur des Detektionsobjektivs. Die axiale Auflösung des Detektionsobjektivs R_{axial} berechnet sich nach:

$$R_{axial-d} = 1,78 \frac{n \cdot \lambda_{em}}{NA_d^2} \quad (6)$$

Das FOV_d des Detektors, letztlich entscheidend für die Bildaufnahme, berechnet sich aus der Multiplikation des FOV_i des Illuminationsobjektivs und der Gesamtvergrößerung M der Detektionsseite.

$$FOV_d = FOV_i \cdot M \quad (7)$$

Unter Einbeziehung des Nyquist-Theorems⁷², das besagt, dass mindestens zwei Pixel benötigt werden, um die Systemauflösung korrekt abzutasten, kann die maximale transversale Auflösung R_T auch in Bezug auf die Pixelgröße des Detektors in x-Richtung px_x angegeben werden. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$R_T = 2 \cdot \frac{px_x}{M} \quad (8)$$

1.1.4 Fluoreszenz in Zellen

Die Fluoreszenz ist ein grundlegendes Phänomen in der optischen Spektroskopie und hat in vielen Bereichen Anwendung gefunden.⁷³ Bei der zellbiologischen Forschung trägt sie eine entscheidende Rolle und bildet die Grundlage für zahlreiche Anwendungen und Experimente.⁷⁴ Die Fluoreszenz beruht auf der Fähigkeit bestimmter Moleküle, sogenannten Fluorophoren, Licht zu absorbieren und anschließend mit einer längeren Wellenlänge zu emittieren.⁷⁵ Dieser Prozess wird durch den Einsatz von Anregungsenergie ermöglicht. Bei der Fluoreszenz wird ein Fluorophor durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, der Anregungslichtquelle, angeregt. Die absorbierte Energie hebt ein Elektron des Fluorophors in einen energetisch höheren Zustand.⁷⁶ Nach einer kurzen Lebensdauer im angeregten Zustand kehrt das Elektron unter Aussendung eines Photons mit einer längeren Wellenlänge in ein niedrigeres angeregtes Schwingungsniveau zurück, wobei Fluoreszenzlicht erzeugt wird. Die schematische Darstellung der Fluoreszenz ist in einem Jablonksi-Diagramm⁷⁷ in Abbildung 4 zu sehen.

zellulären Prozessen und Signalwegen auf der mikroskopischen Ebene. Ein wichtiger Vorteil der Fluoreszenz in Zellen ist die Möglichkeit der Mehrkanal-Bildgebung.⁸⁰ Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen können mehrere Zielstrukturen gleichzeitig markiert und im gleichen Bild erfasst werden. Dies ermöglicht die Untersuchung von Wechselwirkungen und Ko-Lokalisierung von Molekülen oder die gleichzeitige Beobachtung mehrerer zellulärer Prozesse.⁸¹

Neben der Möglichkeit, gezielt einzelne Zellbestandteile mit Fluorophoren einzufärben, existieren in biologischen Proben natürliche Floreszenzen, die von zellulären Komponenten und Molekülen ohne Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen erzeugt werden.^{82,83} Diese sogenannte Autofluoreszenz kann sowohl von endogenen fluorophoren Molekülen stammen als auch von Metaboliten und Stoffwechselprodukten.⁸³ Die Autofluoreszenz in Zellen kann von verschiedenen Komponenten verursacht werden, darunter Nukleinsäuren (DNA, RNA), Proteine, Lipide und Metaboliten wie NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) und FAD (Flavinadenindinukleotid).⁸⁴⁻⁸⁷

Die Autofluoreszenz hat sowohl Vorteile als auch Nachteile. Einerseits kann sie als endogene Markierung genutzt werden, um spezifische zelluläre Komponenten oder Prozesse zu visualisieren, ohne die Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen.⁸² Dies kann Zeit und Kosten sparen und die Komplexität der Experimente reduzieren. Darüber hinaus kann die Autofluoreszenz in Kombination mit anderen Markern oder Farbstoffen verwendet werden, um spezifische Zellkomponenten oder Wechselwirkungen zu analysieren.^{82,83} Andererseits kann die Autofluoreszenz auch zu Herausforderungen führen, insbesondere wenn schwache Signale erfasst werden müssen oder wenn die Autofluoreszenz mit den gewünschten Signalen überlappt.^{88,89} Die Intensität der Autofluoreszenz kann von Zelle zu Zelle und von Gewebe zu Gewebe variieren, was die genaue Quantifizierung und Interpretation der Daten erschwert. Zusätzlich kann die Autofluoreszenz im Laufe der Zeit variieren und von externen Faktoren wie der Exposition gegenüber Licht und Umgebungseinflüssen beeinflusst werden.^{82,83}

Zur Berechnung und Quantifizierung der Fluoreszenz werden verschiedene Formeln und Gleichungen verwendet. Eine der wichtigsten Parameter ist die Quantenausbeute Φ (Phi).⁹⁰ Diese gibt an, wie effizient ein Fluorophor Licht absorbiert und emittiert. Die Berechnung erfolgt aus dem Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen N_{em} zur Anzahl der absorbierten Photonen N_{abs} .

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (9)$$

Ein weiterer Parameter ist der Extinktionskoeffizient ε (Epsilon), der angibt, wie stark ein Fluorophor Licht bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert.⁹⁰ Der Extinktionskoeffizient ist abgeleitet vom Lambert-Beer-Gesetz, das die Absorption von Licht durch ein Medium in

Abhängigkeit von der Konzentration der absorbierenden Substanz angibt.⁹¹ Das Lambert-Beer-Gesetz ist eine fundamentale Gleichung und basiert auf der Annahme, dass die Absorption eines Lichtstrahls durch die Lösung durch Wechselwirkungen zwischen dem Licht und den absorbierenden Molekülen verursacht wird. Es berechnet sich wie folgt:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (10)$$

E_{λ} ist hierbei die Extinktion (Absorption des Materials für Licht der Wellenlänge λ), ε_{λ} der Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c die Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz und d die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers. Die Extinktion kann auch unter dem Begriff der Transmission T dargestellt werden. Die Transmission T beschreibt die Änderung der Lichtintensität I der gemessenen Probe im Verhältnis zur Intensität zum Start der Messung I_0 .

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (11)$$

Der Extinktionskoeffizient ε berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\varepsilon_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot d} \quad (12)$$

Der Extinktionskoeffizient ε wird oft in Einheiten von $\frac{L}{mol \cdot cm}$ angegeben und kann experimentell bestimmt oder aus Datenbanken abgeleitet werden.

Ein weiterer Parameter ist das Intensitätsverhältnis, mit der die relative Intensität eines Fluoreszenzsignals quantifiziert wird. Das Intensitätsverhältnis wird wie folgt berechnet:

$$Ratio = \frac{I_{Fl}}{I_{Re}} \quad (13)$$

I_{Fl} steht dabei für die Intensität des Fluoreszenzsignals der Probe und I_{Re} für die Intensität der Fluoreszenz des Referenzsignals.

Ein letzter Parameter ist die Fluoreszenzlebensdauer, die die mittlere Zeit angibt, die ein Molekül in angeregtem Zustand verweilt, bevor es ein Photon emittiert und in den Grundzustand zurückfällt.⁷⁹ Die Lebensdauer folgt dabei einem exponentiellen Gesetz:

$$I(t) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (14)$$

Hierbei gibt I_0 die Fluoreszenzintensität direkt nach dem Laserimpuls an, t die Zeit und τ (Tau) die Fluoreszenzlebensdauer.

Obwohl die Fluoreszenz in der biologischen Forschung eine weitverbreitete und wertvolle Methode ist, gibt es auch Nachteile, die im Zusammenhang mit biologischen Proben zu berücksichtigen sind. Einer der Nachteile besteht in der bereits erwähnten Phototoxizität, bei der die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bei wiederholter Exposition gegenüber dem anregenden Licht schädliche Effekte auf die Zellen hervorrufen kann und damit potentiell eine Beeinflussung der Ergebnisse bewirkt.⁹² Ein weiterer Nachteil ist das Photobleaching, bei der die Fluoreszenzintensität der Farbstoffe im Laufe der Zeit abnimmt.⁹³ Dies begrenzt die Dauerhaftigkeit der Fluoreszenzsignale und erfordert den Einsatz photostabiler Farbstoffe sowie spezielle Imaging-Bedingungen, wie niedrige Lichtintensität und kurze Belichtungszeiten.⁹⁴ Ein weiterer Aspekt sind die potenziellen toxischen Effekte einiger Fluoreszenzfarbstoffe auf lebende Zellen. Diese können die physiologischen Funktionen beeinträchtigen.⁹⁴ Die Fluoreszenz in dicken Geweben oder lebenden Organismen hat eine begrenzte Eindringtiefe des anregenden Lichts.⁹⁴ Dadurch ist die räumliche Auflösung begrenzt und die Fluoreszenzsignale können unscharf erscheinen.

Fortschritte in der Technologie, wie die Verwendung von lichtscheibenbasierten Mikroskopietechniken, können dazu beitragen, die Nachteile zu überwinden. Durch lichtscheibenbasierte Mikroskopietechniken wird beispielsweise das Photobleaching bei der Fluoreszenzmikroskopie reduziert.⁹⁵ Die gezielte Beleuchtung eines dünnen Probenbereichs verringert die Exposition der Fluoreszenzfarbstoffe gegenüber bleichendem Licht. Die schnelle 3D-Bildgebung minimiert die Belichtungszeit und trägt weiter zur Reduzierung des Photobleachings bei. Dadurch ermöglichen diese Techniken längere und zuverlässigere Beobachtungen lebender Zellen und biologischer Prozesse.⁹⁵ Auch die Kombination mit weiteren spektroskopischen Effekten in Kombination mit einem Lichtscheibenmikroskop kann dazu beitragen, zusätzliche Informationen über die chemische Zusammensetzung und die Struktur von Proben zu erhalten.^{96,97} Ein solcher spektroskopische Effekt ist die Raman-Spektroskopie basierend auf dem Raman-Effekt.

1.1.5 Der Raman-Effekt

Der Raman-Effekt ist ein vom indischen Physiker Sir C. V. Raman im Jahr 1928 entdeckter physikalischer Vorgang, für den der Nobelpreis in Physik verliehen wurde.⁹⁸ Nach seinem Entdecker benannt, beschreibt der Raman-Effekt die Streuung von Licht an Molekülen und der damit verbundenen Frequenzverschiebung des gestreuten Lichts.⁹⁹ Beim Raman-Effekt wird ein Laserlicht in eine Probe eingestrahlt. Ein Teil des Lichts wird elastisch gestreut und hat die gleiche Frequenz wie das eingestrahlte Licht. Dieser Teil wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet.¹⁰⁰ Ein anderer Teil des Lichts wird jedoch inelastisch gestreut und erfährt eine Frequenzverschiebung.¹⁰¹ Diese Frequenzverschiebung ist charakteristisch für die chemische Zusammensetzung und Struktur der Probe. Abhängig davon, ob die Frequenzverschiebung

länger- oder kürzerwellig ist, spricht man von Stokes bzw. von Anti-Stokes-Streuung. Abbildung 5 zeigt die einzelnen Vorgänge bei der Raman-Spektroskopie.

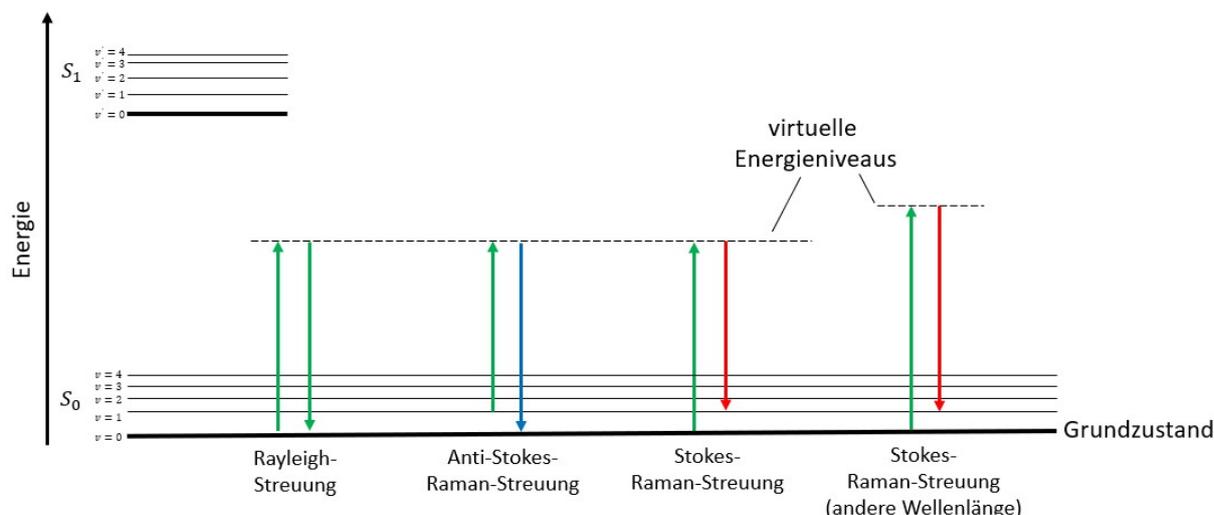


Abbildung 5: Verschiedene Anregungszustände des Raman-Effekts dargestellt in einem Jablonski-Diagramm.¹⁰²

Wenn ein Photon auf ein Molekül trifft, kann es das Molekül zu einem virtuellen angeregten Zustand versetzen (gestrichelte Linie). Da dieser Zustand quantenmechanisch instabil ist, relaxiert das Molekül sofort in den elektronischen Grundzustand zurück und emittiert dabei ein Raman-gestreutes Photon.⁹⁹ Die Literatur besagt, dass gemäß der Boltzmann-Verteilung die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül bei Raumtemperatur bereits in einem angeregten Zustand ist, in der Größenordnung von 0,1 % liegt.¹⁰³ Allerdings zeigen eigene Messungen bei einer Temperatur von 300 K und einem Energieniveau von 300 cm^{-1} eine signifikant höhere Größenordnung von bis zu 5 %. Dieses Phänomen der Raman-Streuung ermöglicht es, Informationen über die Schwingungen und Molekülstrukturen in einer Probe zu gewinnen und somit die Identifizierung von Molekülen und deren chemischen Eigenschaften.⁹⁹ Für die Veranschaulichung der verschiedenen Schwingungsmodi wird in Abbildung 6 eine CH_2 -Bindung betrachtet.

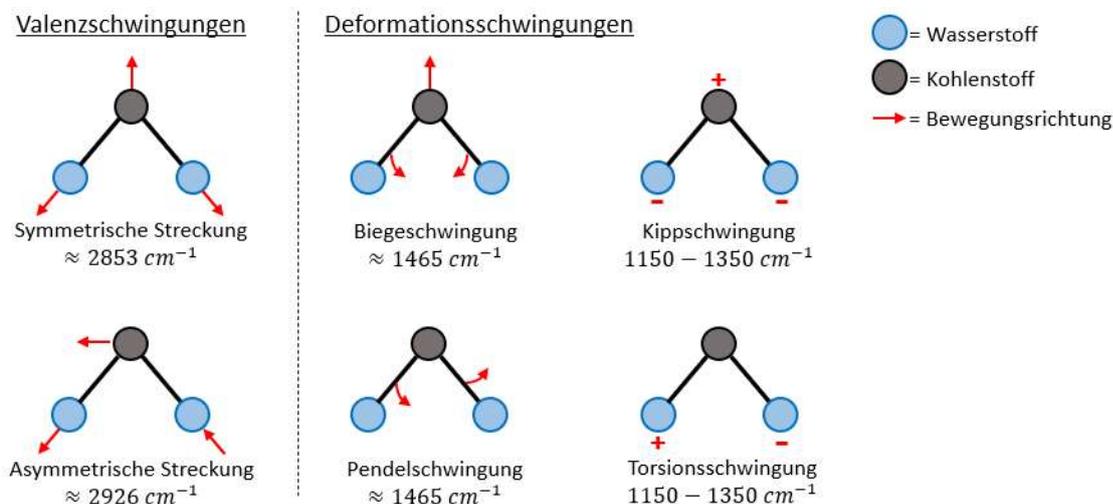


Abbildung 6: Mögliche Schwingungsmodi eines CH_2 -Moleküls bei der Raman-Spektroskopie.^{104,105}

Die einzigartigen Raman-Signaturen, die durch die Kombination von Schwingungsmodi entstehen, ermöglichen eine detaillierte Analyse und Identifizierung von Molekülverbindungen in der Probe.¹⁰⁴ Der Raman-Effekt ermöglicht die Untersuchung von Molekülen auf molekularer Ebene. Er liefert neben den Informationen über die chemische Zusammensetzung auch Informationen über molekulare Struktur, Bindungsenergien, Kristallstrukturen und Phasenübergänge.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Im Gegensatz zu anderen spektroskopischen Methoden erfordert Raman Spektroskopie keine spezifische Markierung der Proben und basiert auf den intrinsischen Eigenschaften der Moleküle. Sie ermöglicht eine nichtinvasive und zerstörungsfreie Analyse.¹¹⁰ Darüber hinaus kann die Raman-Spektroskopie in verschiedenen Umgebungen eingesetzt werden, einschließlich Festkörpern, Flüssigkeiten und Gasen. In Bezug auf die biologisch-medizinische Forschung findet der Raman-Effekt in den letzten Jahren erheblich mehr Anklang.¹¹¹

Durch die Analyse der Raman-Spektren können Informationen über die chemische Zusammensetzung und Struktur der Zellen gewonnen werden, was eine genaue Identifizierung von Mikroorganismen ermöglicht. Ein Hauptvorteil der Raman-Spektroskopie in der Mikrobiologie ist ihre Fähigkeit, sowohl kultivierte als auch nicht kultivierte Mikroorganismen zu analysieren.¹¹² Die Raman-Spektroskopie ermöglicht die direkte Analyse von Einzelzellen in ihrer natürlichen Umgebung, was zu einer umfassenderen Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften führt. Da jeder Organismus ein individuelles Raman-Spektrum besitzt, das auf den spezifischen Molekülverbindungen und der Anordnung der Zellen basiert, lassen sich Mikroorganismen oder einzelne Zellen innerhalb von 3D-Zellkulturen schnell und zuverlässig identifizieren.¹¹³ Darüber hinaus ermöglicht die Raman-Spektroskopie die Untersuchung von physiologischen Zuständen und biochemischen Veränderungen in den Zellen. Durch die Analyse von Raman-Spektren können Informationen über den Stoffwechsel, die Zellatmung, die Aufnahme von Nährstoffen und andere zelluläre Prozesse gewonnen werden.¹¹⁴

Bei der herkömmlichen Verwendung mit 3D-Zellkulturen gibt es jedoch auch Nachteile, die zu beachten sind. Vor allem die erhöhte Lichtstreuung in 3D-Zellkulturen, die durch das Vorhandensein von Gewebe und extrazellulärer Matrix verursacht wird, erzeugt Störsignale.¹¹⁵ Diese können die Raman-Signale überlagern und die Qualität der Spektren beeinträchtigen. Dies kann zu einer verringerten Empfindlichkeit und Auflösung führen. Ein weiterer Nachteil besteht in der Autofluoreszenz, die bei 3D-Zellkulturen, insbesondere Gewebekulturen, auftreten kann.^{82,83} Die geringe Eindringtiefe des Lichts ist ebenfalls ein Nachteil.¹¹⁶ Die Raman-Spektroskopie ist in der Regel oberflächensensitiv, was bedeutet, dass das Laserlicht nur in die oberen Schichten der 3D-Zellkulturen eindringen kann. Dies kann die Analyse tiefer liegender Zellschichten erschweren und zu einer eingeschränkten räumlichen Auflösung führen. Die Interpretation der Raman-Spektren kann komplex sein, da die Beiträge der

verschiedenen Zellkomponenten quantifiziert und berücksichtigt werden müssen. Eine letzte Herausforderung stellt die Probevorbereitung dar. Für die Raman-Spektroskopie müssen die 3D-Zellkulturen möglicherweise fixiert, dehydriert oder eingefroren werden, um die strukturelle Integrität zu erhalten und Hintergrundsignale zu minimieren.¹¹⁷ Diese Schritte können jedoch die chemische Zusammensetzung der Zellen beeinflussen und zu Artefakten führen.

Zur Berechnung und Quantifizierung der einzelnen Raman-Parameter werden verschiedene Formeln und Gleichungen verwendet. Der wichtigste Parameter ist hierbei die Raman-Verschiebung $\Delta\nu$ (Ny).^{118,119} Die Raman-Verschiebung gibt die Differenz zwischen eingestrahlt Lichtfrequenz ν_0 und der gestreuten Lichtfrequenz ν an und wird in der Einheit Wellenzahl cm^{-1} angegeben. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\Delta\nu = \nu - \nu_0 \quad (15)$$

Die Einheit Wellenzahl findet Verwendung in der Darstellung der Raman-Spektren und ist definiert als die reziproke Darstellung der Wellenlänge des gestreuten Lichts.¹²⁰

$$\nu = \frac{1}{\lambda} \quad (16)$$

Die Raman-Verschiebung kann auch in Bezug auf die Wellenzahl angegeben werden.

Ein weiterer Parameter ist das Signalverhältnis I_{Ratio} zwischen der Intensität des Raman-Signals I_{Ra} und der Intensität des eingestrahlt Lichts I_L .^{99,121} Es kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$I_{ratio} = \frac{I_{Ra}}{I_L} \quad (17)$$

Weiterhin ist auch der Streuquerschnitt σ (Sigma) relevant. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Raman-Ereignis auftritt. Berechnet wird er über das Signalverhältnis I und der Anzahl der Streueignisse N .

$$\sigma = I \cdot \frac{1}{N} = \left(\frac{I_{Ra}}{I_L} \right) \cdot \frac{1}{N} \quad (18)$$

Die Anregung des Raman-Effekts und der daraus resultierenden Signalintensität I ist proportional zum Produkt der Frequenz des Anregungslasers ν_L multipliziert mit der Intensität der Anregungsstrahlung I_0 und der Anzahl der Moleküle im Ausgangszustand N .

$$I \propto \nu_L^4 \cdot I_0 \cdot N \quad (19)$$

Die Auftrittswahrscheinlichkeit des Raman-Effekts beträgt lediglich 1 zu 10^6 bis 10^8 .¹²¹ Das bedeutet, dass nur ein winziger Prozentsatz des gestreuten Lichts den Raman-Effekt zeigt,

während der Großteil des gestreuten Lichts elastisch gestreut wird. Daher ist es notwendig, empfindliche Detektoren und spezielle Techniken für den Nachweis einzusetzen.

Die Raman-Spektroskopie stellt im Vergleich zur Fluoreszenz-Spektroskopie konträre Anforderungen an die zu untersuchenden Proben und bietet aufgrund der Vorteile eine komplementäre Erweiterung zu der Fluoreszenz-Spektroskopie.¹²² In Tabelle 3 sind beide Spektroskopie-Arten gegenübergestellt.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Unterschiede zwischen Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie anhand spezifischer Merkmale.^{75,122}

Merkmal	Fluoreszenz	Raman
Grundlage	Anregung von Fluorophoren durch Absorption von Photonen	Raman-Streuung von Photonen durch Wechselwirkung mit molekularen Schwingungen
Emissionsmechanismus	Emission von Licht mit geringerer Energie im Vergleich zu den absorbierten Photonen	Emission von Licht mit derselben Energie wie die gestreuten Photonen
Spektrale Information	Emissionsspektrum: Anregungs- und Emissionswellenlängen, Fluoreszenzintensität, Lebensdauer der Fluoreszenz	Raman-Spektrum: Frequenzverschiebung (Raman-Verschiebung), Raman-Intensität der Peaks
Empfindlichkeit	Hohe Empfindlichkeit für stark fluoreszierende Proben	Geringere Empfindlichkeit im Vergleich zur Fluoreszenz, erfordert längere Messzeiten
Phototoxizität	Kann zelluläre Schäden verursachen	Geringe Phototoxizität, minimale Schädigung von Proben
Hintergrundrauschen	Unterliegt dem Hintergrundrauschen durch Autofluoreszenz und Streuung	Unterliegt dem Hintergrundrauschen durch Streuung des Anregungslasers
Molekulare Spezifität	Erfordert spezifische Markierung mit Fluorophoren für die Zielstruktur	Keine spezifische Markierung erforderlich, basiert auf der chemischen Zusammensetzung
Eindringtiefe	Begrenzte Eindringtiefe in biologisches Gewebe	Größere Eindringtiefe in biologisches Gewebe
Anwendungsgebiete	Zellbiologie, molekulare Bildgebung, immunologische Assays, Genexpressionsstudien	Materialwissenschaften, molekulare Analyse, Qualitätskontrolle, pharmazeutische Forschung

1.1.6 Anwendung des Lichtscheiben-Raman-Mikroskops bei Zellkulturen

Die Kombination von Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie in Verbindung mit der Lichtscheibenmikroskopie in Form eines Lichtscheiben-Raman-Mikroskops (LSRM) ermöglicht eine umfassende Charakterisierung von 3D-Zellkulturen und die Gewinnung von mehrdimensionalen Informationen. Diese Methode erlaubt die Untersuchung sowohl struktureller als auch molekularer Aspekte und ermöglicht es, komplexe biologische Prozesse innerhalb der Zellen zu erforschen. Die elastische Lichtstreuung (Rayleigh-Streuung) wird verwendet, um morphologische Eigenschaften der 3D-Zellkulturen zu generieren und darzustellen. Mit ihrer hohen Intensität und axialen Auflösung ermöglicht die LSRM eine schnelle Bildaufnahme und fungiert als effektive Qualitätskontrolle, um die Integrität und

korrekte Positionierung der Proben zu überprüfen und somit Zeit bei den Messungen zu sparen. Die Fluoreszenz-Spektroskopie ermöglicht die gezielte Darstellung spezifischer Zellen oder Zellbestandteile und vereinfacht somit die Visualisierung komplexer biologischer Proben. Durch die gezielte Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszierenden Proteinen an bestimmte Zielmoleküle können präzise Strukturen in Geweben und Zellen identifiziert und untersucht werden. Die Autofluoreszenz, bei der unmarkierte Zellbestandteile spontan fluoreszieren, bietet eine nicht-invasive Methode zur Visualisierung intrinsischer Moleküle. Obwohl die Autofluoreszenz nicht selektiv ist und mehrere Strukturen gleichzeitig beleuchten kann, ergänzt sie die gezielte Fluoreszenz-Markierung und erweitert das Potenzial der LSM. Die Raman-Spektroskopie ermöglicht die gezielte Detektion unmarkierter Moleküle, wie beispielsweise der C-H-Bindung, die durch charakteristische Peaks bei 1450 cm^{-1} und im Bereich zwischen 2800 und 3000 cm^{-1} im Raman-Spektrum identifiziert werden kann.¹⁰⁵ Dadurch können spezifische Substanzen wie Kollagen nachgewiesen werden. Durch den Einsatz eines längerwelligen Lasers kann die Autofluoreszenz minimiert und die Raman-Signale deutlich hervorgehoben werden.

Die Kombination von Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie mit der LSM eröffnet somit neue Möglichkeiten für eine umfassende und präzise Analyse von 3D-Zellkulturen und ermöglicht die gleichzeitige Erfassung struktureller und molekularer Informationen innerhalb komplexer biologischer Proben.¹²³⁻¹²⁵

1.2 Bezug zur Problemstellung

Die theoretische Untersuchung des Lichtscheibenmikroskops, das Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie miteinander kombiniert, zeigt klar auf, dass diese kombinierte Anwendung im mikrobiologischen und medizinischen Kontext für 3D-Zellkulturen vielversprechend ist. Darüber hinaus verdeutlicht die Analyse der vielfältigen Möglichkeiten in der modularen Bildgebung, dass durch die Auswahl geeigneter Anregungswellenlängen und Detektionsbereiche verschiedene, für die Forschung relevante Substanzen dargestellt werden können. Dies könnte die Untersuchung komplexer Gewebestrukturen ermöglichen.

Ausgewählte Kombinationen der unterschiedlichen Einstellmöglichkeiten können auch bei der geplanten Umsetzung des LSM wesentliche Vorteile bei der Datengenerierung liefern. Die daraus resultierenden Datensätze lassen sich unter passenden Umständen auch mit weiteren Messmethoden (z.B. der Massenspektrometrie oder der FT-IR-Bildgebung) vergleichen und kombinieren. Die genannten Methoden können neben der klassischen fluoreszenzbasierten Lichtscheibenmikroskopie als Referenz zu dem entwickelten System dienen.

2 Material und Methoden

Das entwickelte LSRM und die vorgesehene Anwendung basiert auf diversen technischen Grundlagen und Entwicklungen, die in diesem Kapitel vorgestellt werden. Die einzelnen Unterkapitel beschäftigen sich mit den Themen:

- Grundlagen des technischen Aufbaus
- Detaillierte Erklärung und Besonderheiten zentraler Komponenten
- Probenauswahl und -präparation
- Messmethodik

Die Notwendigkeit und Funktionalität spezieller Komponenten werden hierbei entsprechend der späteren Anwendung erläutert. In den jeweiligen Unterabschnitten wird auch detailliert erläutert, worauf bei der Vorbereitung der Proben geachtet wird und wie die Messergebnisse analysiert werden.

2.1 Grundlagen des technischen Aufbaus

Die Basis für den technischen Aufbau des LSRM ist die OpenSPIM-Plattform,¹²⁶ die einen Open-Source-Ansatz für fluoreszenzbasierte Lichtscheibenmikroskope zur Verfügung stellt. Mit dem entwickelten Lichtscheibenmikroskop wird dieser Ansatz, um die Abbildungsmodalitäten der Rayleigh- und Raman-Streuung erweitert.¹²⁷ Durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Laserquellen können unterschiedliche, den Anforderungen entsprechende elektromagnetische Wechselwirkungen initiiert werden. Die Lichtgänge der beiden Laser werden koaxial ausgerichtet, bevor durch spezielle optische Elemente ein Lichtblatt erzeugt wird. Um zu gewährleisten, dass alle Effekte der einzelnen Modalitäten entsprechend der diskreten Spektralinformationen detektiert werden können, wird ein breitbandiger, durchstimmbarer Spektralfilter integriert.¹²⁷ In Abbildungen 7 und 8 ist der optische Aufbau des LSRM mit der Standarddetektionsmethode einer Kamera in schematischer und als CAD-Modell in isometrischer Darstellung dargestellt.

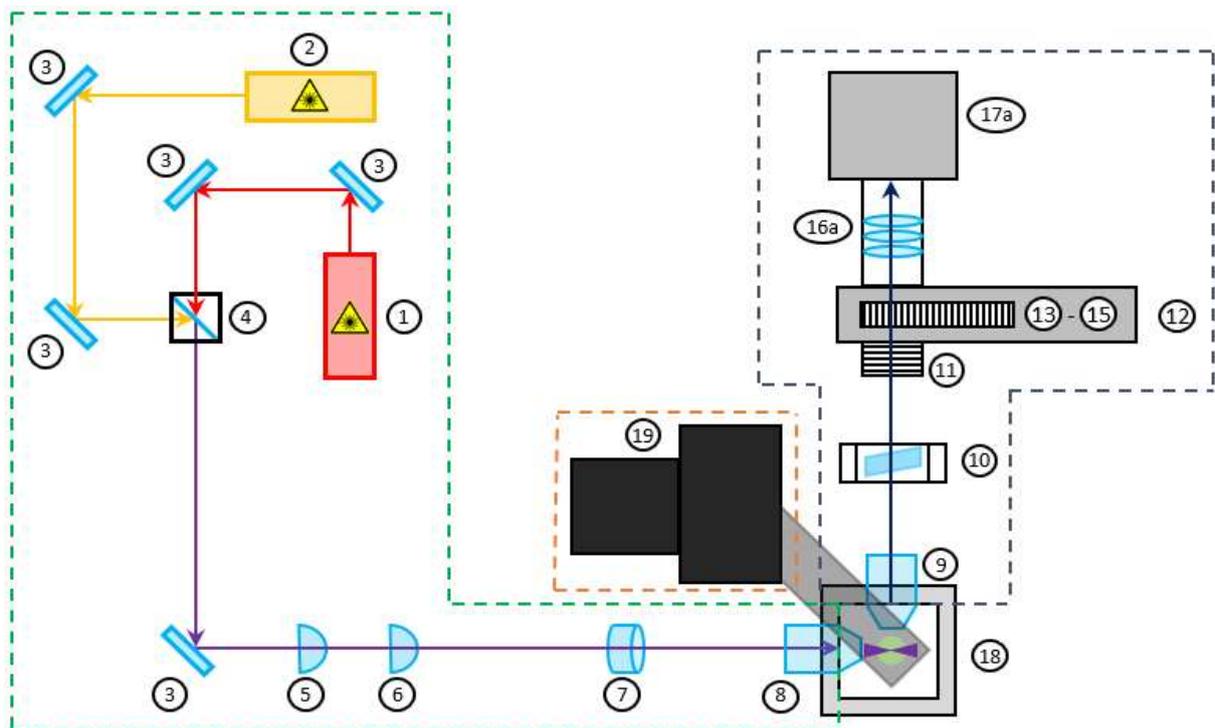


Abbildung 7: Schematische Darstellung des LSRM mit angeschlossener sCMOS-Kamera als Standarddetektionsmethode. Die farbigen Linien repräsentieren den optischen Weg der Laserstrahlen (Rot: 785 nm Laser; Gelb: 660 nm Laser; Lila: coaxialer Strahlengang beider Laser). Die drei durch gestrichelte Linien gekennzeichneten funktionellen Sektoren sind der Illuminationspfad (Grün), die der Detektionspfad (Grau) sowie das mechanische Positioniersystem (Orange). Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Komponenten ist in Tabelle 4 dargestellt.¹²⁷

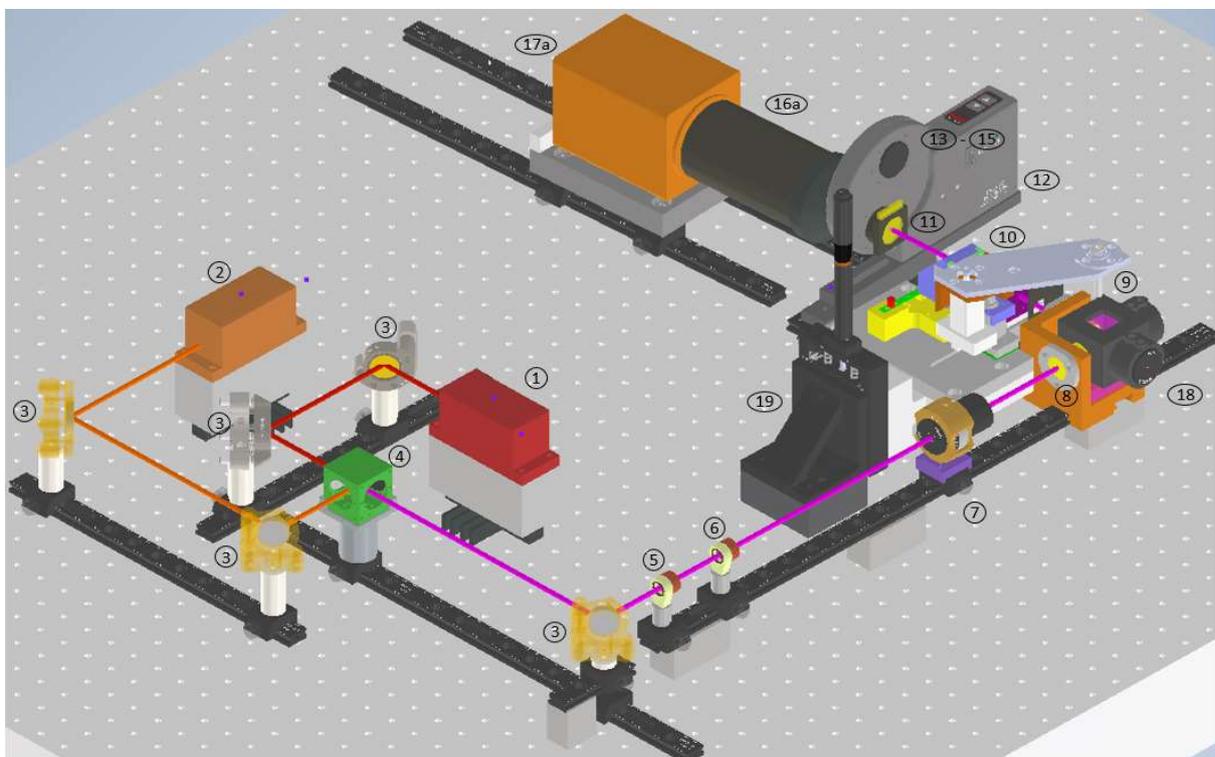


Abbildung 8: Isometrische Darstellung des CAD-Modells des LSRM mit angeschlossener sCMOS-Kamera als Standarddetektionsmethode. Durch die farbigen Linien wird der optische Weg der unterschiedlichen Laserstrahlen dargestellt (Rot: 785 nm Laser; Orange: 660 nm Laser; Lila: coaxialer Strahlengang beider Laser).¹²⁷

Das LSRM ist, wie in Abbildung 7 dargestellt, in drei Bereiche unterteilt: Der *Illuminationspfad*, das *mechanische Positioniersystem* sowie der *Detektionspfad*.

Der *Illuminationspfad*, bestehend aus zwei Lasern, fünf kinematisch gelagerten Reflexions- spiegeln, einem dichroitischen Spiegel, zwei sphärischen Linsen, einer zylindrischen Linse sowie einem Mikroskopobjektiv, genannt Beleuchtungsobjektiv. Die beiden Laser mit einer Emissionswellenlänge von 785 nm (Laser 1) und 660 nm (Laser 2) emittieren kollimierte Strahlen, deren Leistung in den Bereichen 0,5 bis 200 mW (Laser 1) bzw. 1 bis 130 mW (Laser 2) einstellbar ist. Die emittierten Strahlen werden über zwei kinematisch gelagerte Reflexionsspiegel, die im 45°-Winkel eingestellt sind und individuell konfigurier werden können, auf das Zentrum des dichroitischen Spiegels geleitet. Pro Laser sind zwei Spiegel notwendig, da der idealerweise kreisrunde Laserstrahl durch jede Spiegelung, die nicht exakt im 45° Winkel durchgeführt wird, zu einem Oval verformt wird und sich die Intensitätsverteilung ändert. Ein zweiter Spiegel wird verwendet, um dem entgegenzuwirken, so dass sich die Form und die Intensitätsverteilung des Laserstrahls bezüglich seiner Austrittsparameter nicht ändern. Die Beschichtung der Spiegel gewährleistet eine höchstmögliche Reflexion von 99,06% (bei 785 nm) bzw. von 99,56% (bei 660 nm) bei beiden ausgewählten Emissionswellenlängen der Laser.¹²⁸ Der dichroitische Spiegel ist in Bezug auf das einstrahlende Licht im 45°-Winkel positioniert und reflektiert das Licht der Wellenlänge 660 nm. Licht der Wellenlänge 785 nm transmittiert durch den dichroitischen Spiegel. Um nachzuweisen, dass beide Laserstrahlen nach Durchlauf durch die vier Spiegel und den dichroitischen Spiegel einen koaxialen Strahlenweg aufweisen und ihre Lichtwege sich überlagern, wird der Verlauf der Strahlpropagation mithilfe eines optischen Strahl- profilmessgeräts (Scanning Slit Optical Beam Profiler BP209-VIS/M, Thorlabs GmbH, Deutschland) erfasst. Dieses Messgerät ist auf einer speziell für diesen Aufbau entwickelten Halterung montiert. Die koaxial verlaufenden Lichtstrahlen werden durch einen fünften Spiegel geleitet und passieren dabei zwei achromatische sphärische Linsen, die in Form eines Kepler- Teleskops angeordnet sind.¹²⁹ Die Näherungsformel für den Vergrößerungsfaktor v lautet wie folgt:¹³⁰

$$v = \frac{f_1}{f_2} \quad (20)$$

Mit den Brennweiten der einzelnen Objektive $f_1 = 25 \text{ mm}$ und $f_2 = 50 \text{ mm}$ ergibt sich ein Vergrößerungsfaktor $v = 2$. Die Verdopplung des Strahldurchmessers optimiert die Ausleuchtung des Beleuchtungsobjektivs. Nach den achromatischen sphärischen Linsen werden die Lichtstrahlen durch eine achromatische Zylinderlinse mit einer Brennweite von

$f = 50 \text{ mm}$ geleitet. Durch die spezielle Form der Linse wird das Licht in nur einer Ebene gebrochen, wie in Abbildung 9 dargestellt.

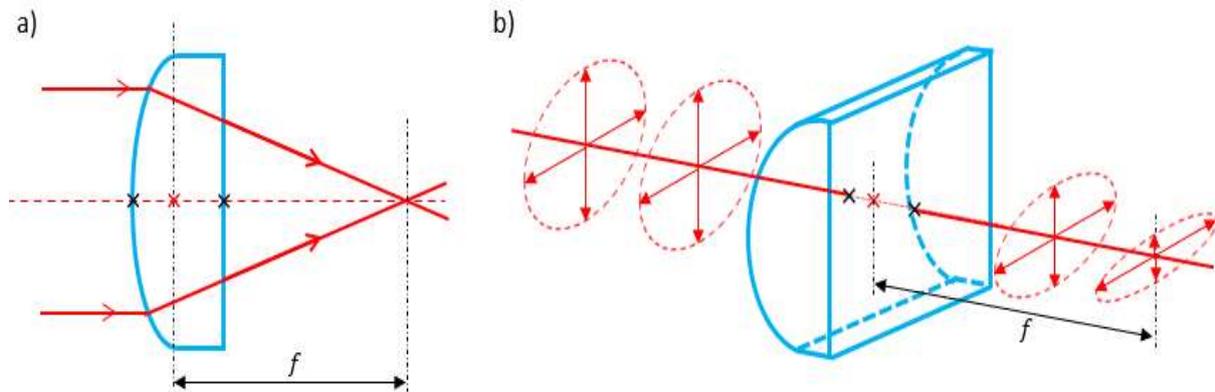


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Strahlengangs durch eine Zylinderlinse. Teil a) zeigt die Seitenansicht des sich durch die Zylinderlinse veränderten Strahlengangs, b) stellt die dreidimensionale Formveränderung eines runden Lichtstrahls dar.⁷⁰

Die Zylinderlinse fokussiert die generierte horizontale Linie auf die hintere Brennebene des Beleuchtungsobjektivs. Das Objektiv hat einen Vergrößerungsfaktor von 10 und projiziert die Laserlinie als vertikalen Lichtbogen in die Brennebene des Detektionsobjektivs in der Probenkammer. Die Orientierung des Lichtbogens wird hierbei durch die Optik des Beleuchtungsobjektivs verändert.¹³¹

Das *mechanische Positioniersystem* besteht aus einer 4D-Verfahreinheit (USB 4D-Stage, Picard Industries, USA), bestehend aus drei linearen Translationsachsen (X-, Y- und Z-Achse) und einer rotatorischen Achse (R-Achse), sowie einer einzelnen externen translatorischen Achse (One-Axis Motorized Translation Stage PT1/M-Z8, Thorlabs GmbH, Deutschland). Die Schrittmotoren der linearen Achsen der 4D-Verfahreinheit haben einen Verfahrweg von 9 mm und eine Auflösung von $1,5 \mu\text{m}$ pro Schritt. Die Rotationsachse rotiert mit einer Auflösung von $1,8^\circ$ pro Schritt. Die 4D-Verfahreinheit ist mittels einer speziell angefertigten Halterung aus dem 3D-Drucker an der PT1/M-Z8-Achse befestigt. Die einachsige translatorische Verfahreinheit hat einen Verfahrweg von 25 mm bei einer Auflösung von $0,03 \mu\text{m}$. Mithilfe dieses kombinierten Positionierungssystems ist es möglich, Daten in mehreren Proben eines Probenarrays sequenziell zu erfassen, ohne dass ein menschlicher Eingriff von außen erforderlich ist. Das mechanische Positioniersystem ermöglicht eine präzise Ausrichtung der zu vermessenden Proben in der Probenkammer, sodass die Schnittebene mit der projizierten Lichtbogen- und der Brennebene des im Detektionspfad befindlichen Detektionsobjektivs übereinstimmt.

Der *Detektionspfad* besteht aus einem Mikroskopobjektiv (Detektionsobjektiv), einem akustooptisch durchstimmbaren bildgebendem Filter, Polarisationsfiltern, einem Filterrad mit bis zu

sechs auf die Anwendung angepassten Filtern sowie einem Tubusobjektiv für die angeschlossene sCMOS-Kamera. Das Detektionsobjektiv weist eine 20fache Vergrößerung auf und ist orthogonal zur Beleuchtungsebene des Lichtblatts angeordnet. Die Aufgabe des Objektivs besteht darin, die emittierten Photonen der beleuchteten Proben entsprechend seiner numerischen Apertur zu sammeln. Das gesammelte Licht wird durch einen akustooptisch abstimmbaren Filter (acousto-optical tunable filter, AOTF) entsprechend der messspezifischen Anwendung spektral selektiert. Der im Inneren verbaute Telluroxidkristall fungiert effektiv als Bandpassfilter mit einer von der Wellenlänge abhängigen Bandbreite zwischen 2 und 5 nm.¹³² Die durch den AOTF selektierten Wellenlängen ändern aufgrund des Schwingverhaltens des Kristalls die Polarisation. Entsprechend der Empfehlung des Herstellers werden nach dem AOTF Polarisationsfilter angebracht, um weitere Störquellen zu eliminieren und nur die selektierten Wellenlängen passieren zu lassen. Das nachfolgende Filterrad besitzt sechs Kammern, in denen je nach Nutzungsmodalität des LSRM entsprechende weitere Filter eingesetzt werden. Dies ist notwendig, wenn Raman- oder Fluoreszenzsignale nahe der Anregungswellenlänge detektiert werden, da die Messsignale durch die hohe Intensität der Laser überlagert werden. Die Abbildung der Probe wird nach dem Filterrad durch eine Tubuslinse (U-TLU, Evident, Deutschland) auf einer Kamera (ORCA-Flash 4.0 LT+, Hamamatsu, Japan) abgebildet. Der wissenschaftlich komplementäre Metall-Oxid-Halbleiter-Chip (scientific complementary metal-oxide-semiconductor, sCMOS) der Kamera besitzt eine effektive Anzahl von 2048 x 2048 Pixel bei einer Pixelgröße von 6,5 x 6,5 μm .¹³³

Der Nachweis, dass es sich bei den gemessenen Signalen um die für die ausgewählte Messmodalität richtigen Wellenlängenbereiche handelt, wird anhand eines Spektrometers (MultiSpec®Raman, tec5 AG, Deutschland) durchgeführt. Anstelle des Kameraobjektivs und der Kamera wird ein Spektrometeradapter an das Filterrad angeschlossen. Die schematische Darstellung des Spektrometeradapters ist in Abbildung 10 zu sehen. Im inneren des 1"-Tubus befindet sich eine asphärische Kondensorlinse mit einer Brennweite von $f = 20 \text{ mm}$. Im Abstand der Brennweite ist eine zweiachsige translatorische Fassung (CXY1, Thorlabs GmbH, Deutschland) montiert mit einem integrierten koaxialen Steckverbinder für Glasfasern (subminiature assembly, SMA). An den SMA-Anschluss wird eine Glasfaser mit einem Durchmesser $d = 550 \mu\text{m}$ angeschlossen. Die Glasfaser leitet das Licht zum angeschlossenen Spektrometer. Die Einstellmöglichkeiten der translatorischen Fassung ermöglichen eine Ausrichtung des SMA-Anschlusses im Brennpunkt der Linse und damit im Punkt der höchsten Intensität.

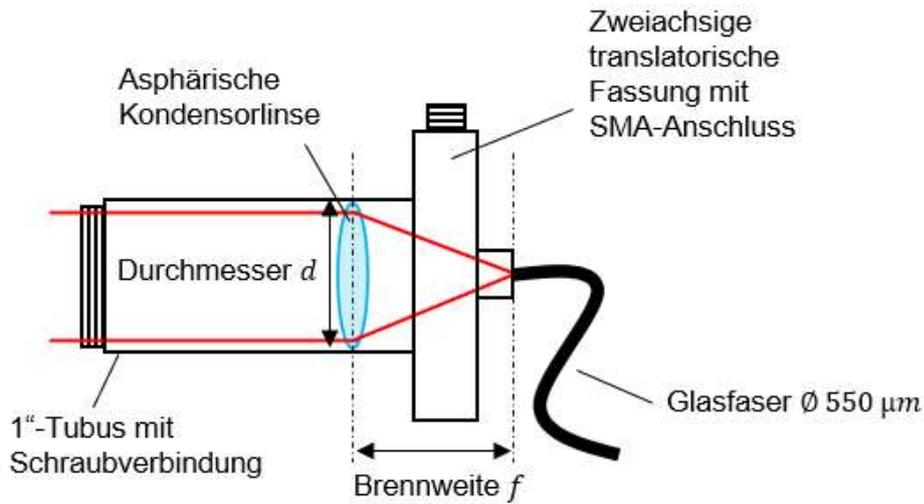


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus des verwendeten Spektrometeradapters.

In Abbildungen 11 wird der optische Aufbau des LSRM mit der zweiten Detektionsvariante dargestellt. Hierfür wird anstelle des Kameraobjektivs und der Kamera ein Spektrometeradapter an das Filtrerrad angebracht und der Adapter über eine Glasfaser mit dem Spektrometer verbunden.

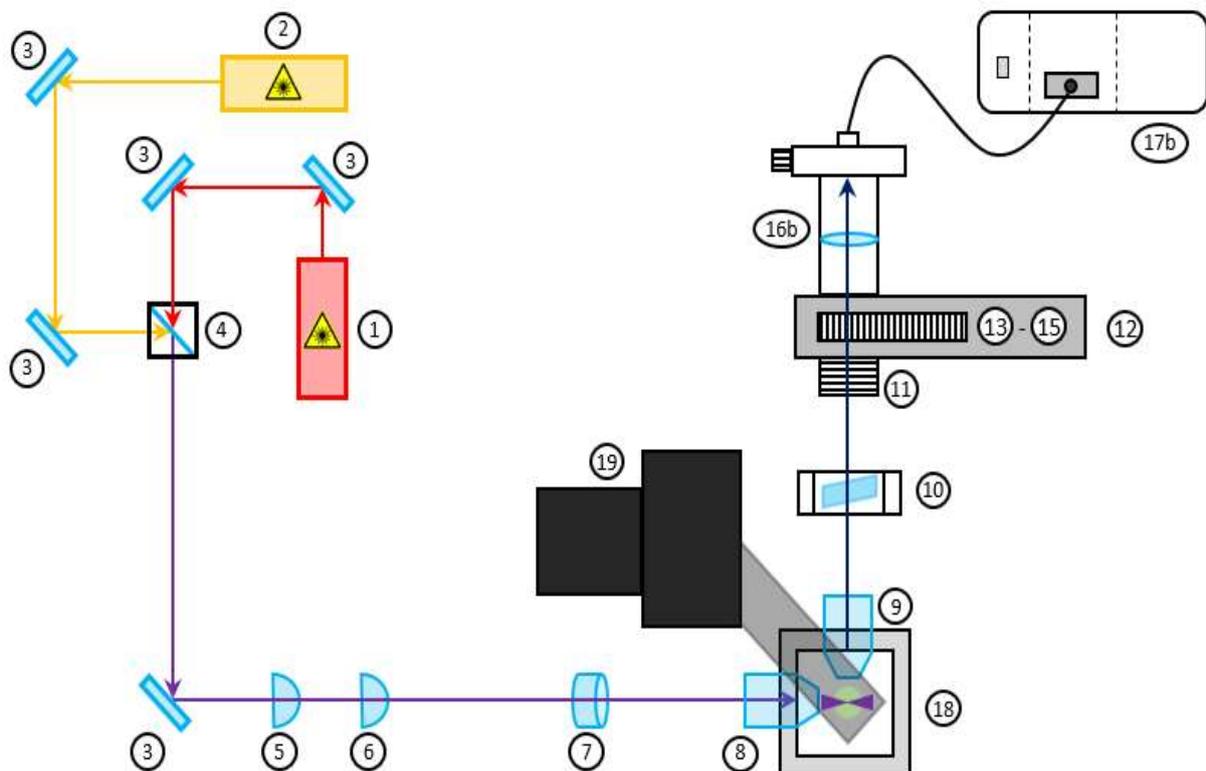


Abbildung 11: Schematische Darstellung des LSRM mit angeschlossenem Spektrometer. Die farbigen Linien repräsentieren den optischen Weg der Laserstrahlen (Rot: 785 nm Laser; Gelb: 660 nm Laser; Lila: coaxialer Strahlengang beider Laser). Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Komponenten ist in Tabelle 4 dargestellt.¹²⁷

Das CAD-Modell der isometrischen Darstellung des LSRM mit angeschlossenem Spektrometeradapter ist in Abbildung 12 gezeigt. Das Spektrometer und die Glasfaser sind in dieser Darstellung nicht abgebildet.

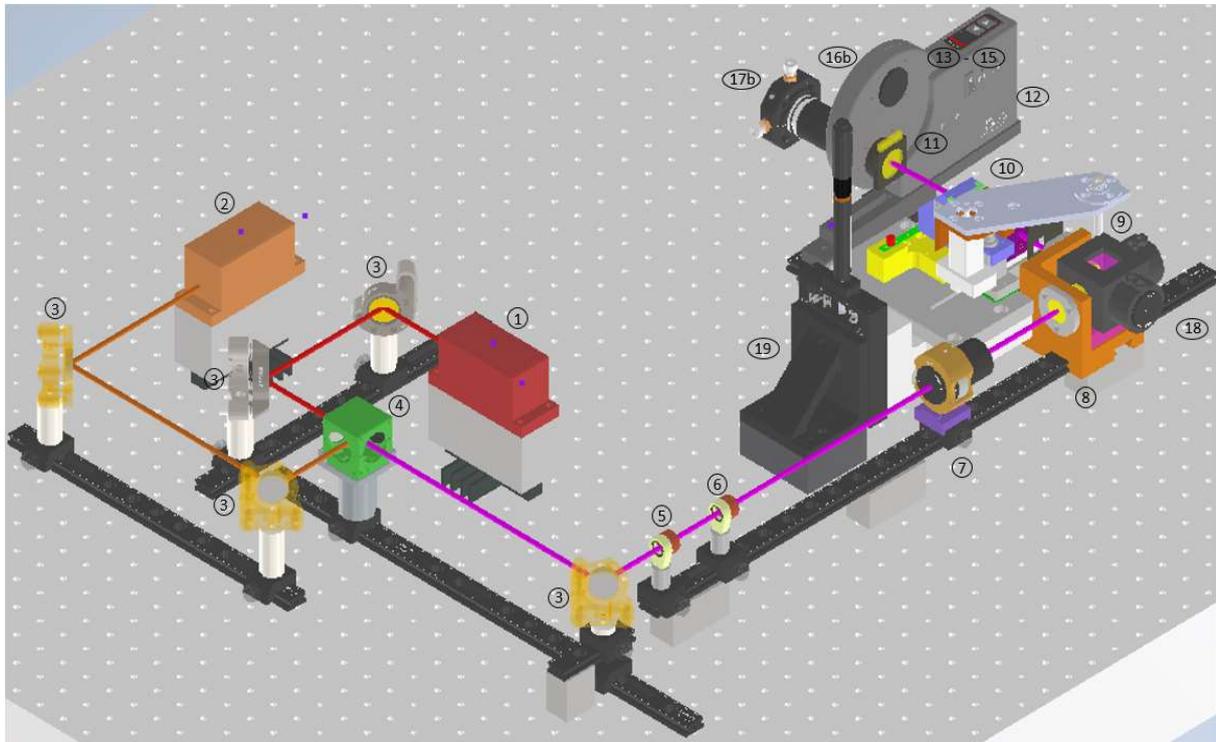


Abbildung 12: Isometrische Darstellung des CAD-Modells des LSRM mit angeschlossenem Spektrometer. Durch die farbigen Linien wird der optische Weg der unterschiedlichen Laserstrahlen dargestellt (Rot: 785 nm Laser; Orange: 660 nm Laser; Lila: koaxialer Strahlengang beider Laser).¹²⁷

In Tabelle 4 sind die detaillierten Bezeichnungen der einzelnen Komponenten des entwickelten LSRM aufgeführt, die den Abbildungen 7, 8, 11 und 12 zugeordnet sind.

Tabelle 4: Detaillierte Bezeichnung der einzelnen Komponenten des LSRM in Bezug auf die Abbildungen 7, 8, 11 und 12.¹²⁷

Nr.	Bauteil	Spezifikation	Hersteller
1	Laser	LuxX+® 785-200 (einstellbar 0 bis 200 mW)	Omicron Laserage GmbH, Deutschland
2	Laser	LuxX+® 660 (einstellbar 0 bis 130 mW)	Omicron Laserage GmbH, Deutschland
3	Spiegel & Halterung	Breitbandspiegel, Ø25,4 mm, EO2 beschichtet, montiert in Polaris K1 Kinematic Mirror Mount	Thorlabs GmbH, Deutschland
4	dichroitischer Strahlteiler	BrightLine Laser 25 mm x 36 mm, Reflexionsband 350 - 671 nm, Transmissionsband 702 - 1200 nm	Semrock, USA
5	Linse	Achromatische Doppellinse, Ø12,7 mm, Brennweite 25 mm, Antireflexbeschichtung 400 - 1100 nm	Thorlabs GmbH, Deutschland
6	Linse	Achromatische Doppellinse, Ø12,7 mm, Brennweite 50 mm, Antireflexbeschichtung 400 - 1100 nm	Thorlabs GmbH, Deutschland
7	Zylinderlinse	Montierte zylindrische achromatische Doppellinse, Ø25,4 mm, Brennweite 50 mm, Antireflexbeschichtung 650 - 1050 nm	Thorlabs GmbH, Deutschland
8	Objektiv	UMPLFLN10XW Wassertauchobjektiv, Vergrößerung 10x, numerische Apertur 0,3, Arbeitsabstand 3,5 mm, Semiapochromat	Evident, Deutschland
9	Objektiv	UMPLFLN20XW Wassertauchobjektiv, Vergrößerung 20x, numerische Apertur 0,5, Arbeitsabstand 3,5 mm, Semiapochromat	Evident, Deutschland
10	AOTF	Bildgebender Acousto-Optischer verstellbarer Filter TEAF-.55-1.0-MSD, Bandbreite 550 bis 1000 nm, optische Apertur 7x7 mm	Brimrose Corp., USA
11	Polarisations-Filter	Diffus reflektierender Folienpolarisator für Nahinfrarotlicht (600 – 1100 nm)	Thorlabs GmbH, Deutschland
12	Filterrad	Motorisierte 6-Positionen-Filterräder für Ø 1" (Ø 25,4 mm) Optiken	Thorlabs GmbH, Deutschland
13	Filter	664 LP Edge Basis-Langpassfilter	Semrock, USA
14	Filter	Einfachkerbfilter für 658 nm - Güteklasse E	Semrock, USA
15	Filter	785 LP Edge Basis-Langpassfilter	Semrock, USA
16a	Kameralinse	Tubuslinse U-TLU & C-mount (U-TV0.5XC-3)	Evident, Deutschland
16b	Adapter für Spektrometer	Asphärische Kondensorlinse, Ø25 mm, Brennweite 20 mm, Antireflexbeschichtung 650 - 1050 nm & CXY1, zweiachsige translatorische Linsenfassung, Ø 550 µm Glasfaser	Thorlabs GmbH, Deutschland
17a	Kamera	sCMOS Kamera ORCA Flash 4.0 LT+	Hamamatsu, Japan
17b	Spektrometer	MultiSpec®Raman	Tec5 AG, Deutschland
18	Messkammer	Aluminium-Montagerahmen, Acryl-Wasserkammer	HS Mannheim, Deutschland
19	Verfahreinheit	USB-4D-Tisch (X, Y, Z, R) & PT1-Z8 Tisch	Picard-Industries, USA Thorlabs GmbH, Deutschland

2.2 Detaillierte Erklärung und Besonderheiten zentraler Komponenten

In diesem Kapitel wird eine ausführliche Darstellung der zentralen Komponenten vorgenommen, wobei besonderes Augenmerk auf ihre spezifischen Eigenschaften und Merkmale gelegt wird. Durch die detaillierte Erklärung werden wichtige Informationen und Erkenntnisse gewonnen, die zur Auswahl und Integration dieser Komponenten in das Gesamtsystem beigetragen haben. Es werden relevante technische Spezifikationen, Funktionalitäten und Leistungskriterien der Komponenten beleuchtet, um ihre Eignung für den vorgesehenen Einsatzzweck im LSRM zu verdeutlichen.

2.2.1 Laser

Bei der Auswahl der Laser wurde entschieden, Emissionswellenlängen von 785 nm und 660 nm zu verwenden. Diese Entscheidung wurde unter Berücksichtigung der Raman-Streuung getroffen, bei der es zu einer Wechselwirkung zwischen mehreren Molekülphotonen kommt. Die Aktivierung des Raman-Effekts wird maßgeblich von der Laserfrequenz bzw. der Wellenlänge beeinflusst, da dies der einflussreichste Parameter ist. Diese Beziehung wird durch Gleichung 21 deutlich:¹³⁴

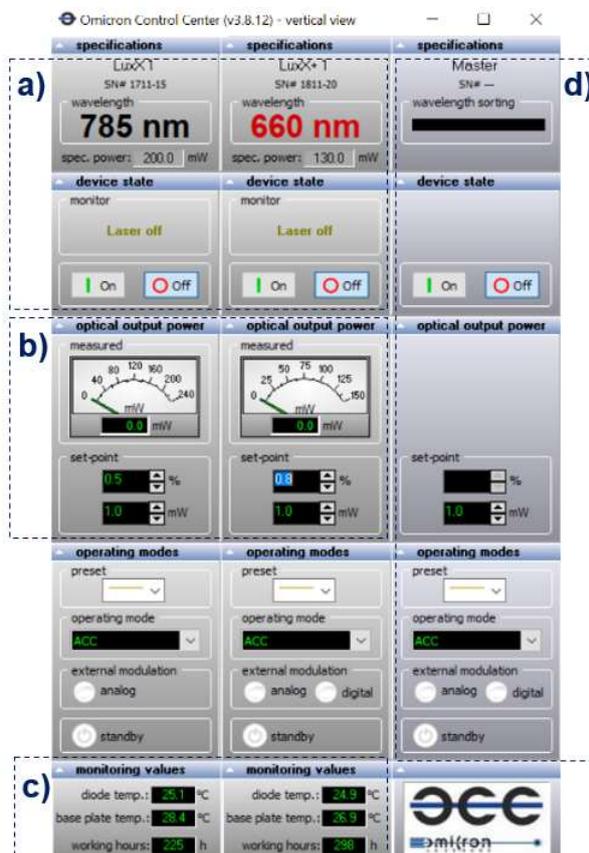
$$I \propto \nu^4 \cdot I_0 \cdot N \quad (21)$$

Hierbei ist I die Intensität, ν die Frequenz der Molekülschwingung bzw. des Lasers, I_0 die Intensität der Anregungsstrahlung und N die Anzahl der Moleküle im Ausgangszustand. Die ausgewählten Laser für das LSRM sind die Modelle Luxx+® 785-200 und Luxx+® 660 (Omicron Laserage GmbH, Deutschland). Bei der Auswahl wurde besonders auf eine hohe Kompatibilität geachtet, wobei sowohl die Bauform als auch die Ansteuerung der Laser relevant waren. Beide Lasermodule bieten die Möglichkeit, die Lichtleistung und das Strahlprofil zu regulieren. In Tabelle 5 sind die wichtigsten Parameter und Unterschiede der beiden Laser aufgeführt.

Tabelle 5: Vergleich der technische Parameter der verwendeten Laser der Firma Omicron Laserage GmbH.¹³⁵

Merkmale	Laser 1	Laser 2
Modell	Luxx+® 785-200	Luxx+® 660
Wellenlänge	785 nm	660 nm
Leistung	0 - 200 mW	0 - 130 mW
Laserschutzklasse	3B	3B
Leistungsstabilität	<0,5 % / 8 h	<0,5 % / 8 h
Betriebsmodus	Dauerstrich	Dauerstrich
Strahldurchmesser	1,42 mm	1,46 mm
Aufwärmzeit	< 180 s	< 180 s
Polarisation	vertikal	vertikal
Abmessungen (L x B x H)	100 x 40 x 40 mm	100 x 40 x 40 mm

Über eine USB-Schnittstelle an einen PC verbunden, lassen sich die Laser mit einer vom Hersteller vorgegebenen Software regulieren. Da die Software sicherheitsrelevante Module beinhaltet, dient diese als Standardsoftware zur Ansteuerung und Überwachung der Laser. Die grafische Benutzeroberfläche (grafical user interface, GUI) der Betriebssoftware (Omicron Control Center, dargestellt in Abbildung 13) erkennt alle angeschlossenen Lasermodule automatisch und erstellt eine geeignete Übersicht.

Abbildung 13: Betriebssoftware der verwendeten Laser mit den Bereichen a) Betriebszustand, b) Leistungseinstellungen, c) Überwachung und d) Master-Einstellungen.¹³⁵

Über ein Auswahlmenü wird in Bereich a) der Betriebszustand der Laser aktiv angesteuert. Der jeweilige Zustand wird neben einer farblichen Hervorhebung des aktiven Tasters auch in Klarschrift darüber angezeigt. Bereich b) ist für die Einstellung der Laserleistung vorgesehen, bei der die Eingabe der gewünschte Leistung in mW über ein digitales Eingabefeld erfolgt. Die reale Leistung sowie die prozentuale Auslastung in Bezug zur Maximalleistung wird über eine digitalisierte Analoganzeige wiedergegeben. Zur Kontrolle der Temperatur von Laserdiode und Platine sowie der Gesamtlaufzeit der Laser sind in Bereich c) weitere digitale Anzeigen. Für den Fall einer Temperaturüberschreitung erscheint eine Warnung und das System schaltet sich automatisch ab. Bei mehreren Lasern bietet die Software einen Master-Bereich d) an, der beide Laser simultan steuert.

2.2.2. Probenkammer und Objektive

Die Immersions-Probenkammer basiert auf den Vorgaben der OpenSPIM-Plattform und besteht aus zwei Komponenten.¹²⁶ Der innere Teil der Probenkammer, gefertigt aus Acrylglas, hat die zentrale Aufgabe der Ausrichtung der zwei verwendeten Mikroskopobjektive in einer orthogonalen Anordnung und der Überlagerung der Fokuspunkte beider Objektive zur Illumination und Detektion der Probe. Der äußere Teil besitzt durch die Fertigung aus Edelstahl die notwendige Stabilität, um alle Komponenten an der korrekten Position verharren zu lassen. Die Objektive sind mit speziell angefertigten Objektivhalterungen an dem äußeren Teil der Probenkammer befestigt. Ebenso ist eine Schwalbenschwanzführung vorhanden, sodass die Probenkammer präzise auf einer Schiene platziert wird. Beide Teile werden mit M8-Senkkopfschrauben miteinander verbunden. Die Fertigung der Komponenten erfolgte jeweils aus einem massiven Werkstoffblock, sodass es zu keinen Schwachstellen an Übergängen kommt. Die beiden Teile der Probenkammer sind in Abbildung 14 zu sehen.

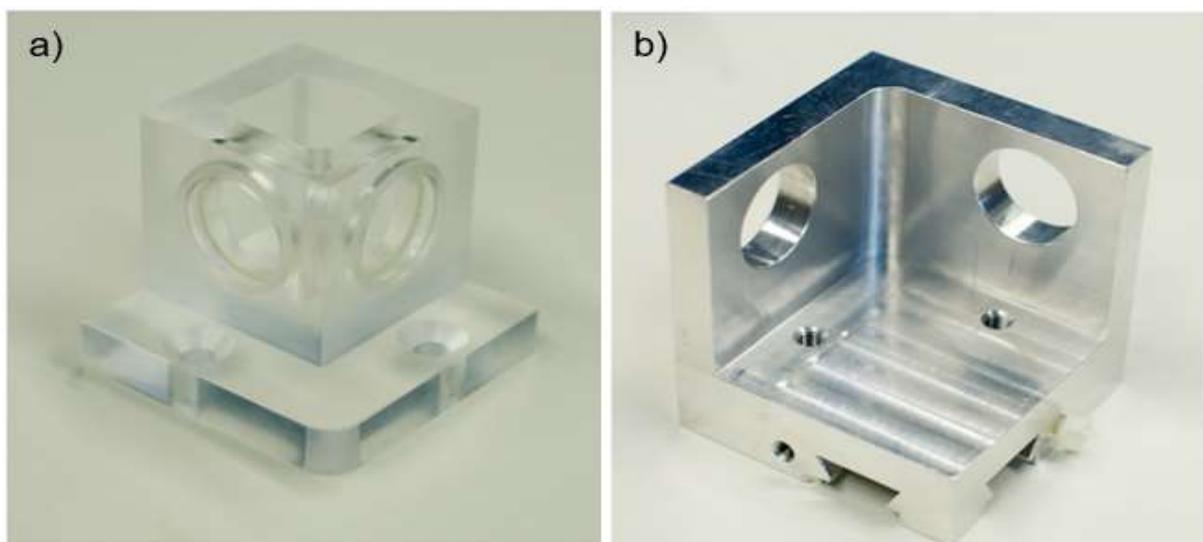


Abbildung 14: Probenkammer des LSRM bestehend aus a) inneren Teil aus Acrylglas und b) äußerem Teil aus Edelstahl.¹³⁶

Die Probenpräparation im LSM erfordert das Einbetten der Sphäroide in ein Agarose-Gel, um sie im Mikroskop präzise zu positionieren und Austrocknung zu vermeiden. Da Wasser und Luft unterschiedliche Brechungsindizes aufweisen ($n_{Wasser} = 1,333$ zu $n_{Luft} = 1,0003$)¹³⁷, entsteht an der Grenzfläche eine Lichtbrechung und der Strahlengang ändert sich.¹³⁷ Um dies zu vermeiden, wird die Probenkammer mit Wasser gefüllt und zu einer Immersionsprobenkammer gemacht. Durch das Brechungsindex-Matching werden kontrastreduzierende Reflexionen und Veränderungen des Lichtwegs vermieden.¹³⁸ Spezielle Immersionsobjektive werden benötigt, die auf den Brechungsindex des Flüssigkeitsmediums abgestimmt sind. Außerdem ist eine ausreichend große Arbeitsdistanz erforderlich, um eine Überlagerung der Fokuspunkte beider Mikroskopobjektive zu ermöglichen. Die Auswahl des Objektivs ist auch abhängig von der numerischen Apertur (NA), die angibt, wie viel Licht in Abhängigkeit vom Brechungsindex und Öffnungswinkel aufgenommen wird.¹³⁹ Bei der Anregung ist eine niedrigere NA erforderlich, da das Lichtblatt nicht vollständig vom Objektiv beleuchtet wird. Eine 10-fache Vergrößerung bewirkt eine Reduzierung der Lichtblattdimensionen um den Faktor 10, da das Objektiv den Lichtweg entgegen der normalen Verwendung auf die Probe fokussiert. Das Detektionsobjektiv dient der Darstellung der Probe und weist neben einer höheren NA zur Lichtsammlung auch eine höhere Vergrößerung von 20 auf. Die Objektive werden mit speziell angefertigten Edelstahlhalterungen am äußeren Teil der Probenkammer befestigt. Die technischen Parameter der ausgewählten Objektive sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Vergleich der technischen Parameter der verwendeten Mikroskopobjektive.¹⁴⁰

Merkmale	Illuminationsobjektiv	Detektionsobjektiv
Hersteller	Evident (ehem. Olympus)	Evident
Modell	UMPLFLN10XW	UMPLFLN20XW
Vergrößerung	10x	20x
Numerische Apertur	0,3	0,5
Arbeitsabstand	3,5 mm	3,5 mm
Sehfeldzahl	26,5	26,5
Parfokalabstand	45 mm	45 mm
Hintere Brennebene	19,1 mm	19,1 mm
Immersionsmedium	Wasser	Wasser

2.2.3 4D-Verfahreinheit

Die Verfahreinheit des Systems dient der exakten Positionierung der Probe innerhalb der Probenkammer und besteht aus insgesamt vier translatorischen und einer rotatorischen Achse. Die einzelnen Achsen sind eine Zusammensetzung mehrerer Einzelkomponenten. Eine 4D-Verfahreinheit von Picard Industries (USA) beinhaltet drei translatorische und eine rotatorische Achse und dient für die Feinpositionierung der Probe innerhalb der Proben-

kammer. Die Schrittweite der einzelnen Achsen wird hierbei mit $1,5 \mu\text{m}$ pro Schritt bzw. $1,8^\circ$ pro Schritt herstellerseitig angegeben.¹⁴¹ Im Zentrum der Rotationsachse ist ein Loch vorhanden, in dem die Proben mit geeigneten Haltern fixiert werden, sodass eine axiale Symmetrie bei korrekter Positionierung der Probe gegeben ist. Die translatorischen Achsen haben einen Verfahrweg von 9 mm. Die vierte translatorische Achse stammt von Thorlabs GmbH (Deutschland). Bei dieser Achse liegt der Fokus auf dem großen Verfahrweg von 25 mm, der es ermöglicht, mehrere Proben in einem Probenarray mit einem speziellen Halter mit mehreren Messkammern zu vermessen. Die minimale Schrittweite von $0,05 \mu\text{m}$ bietet zudem eine weitere Option bei der Feinjustage.¹⁴² Primär dient diese Achse aber der Grobpositionierung des Probenhalters in der Probenkammer. Eine entwickelte und mit dem 3D-Drucker hergestellte Kopplung verbindet beide Komponenten. Die einzelnen Komponenten werden über eine serielle Schnittstelle mittels USB-Kabel mit dem PC verbunden. Eine eigens dafür entwickelte Software steuert die vollständige Verfahreinheit an. Die zusammengebaute Verfahreinheit ist in Abbildung 15 dargestellt.

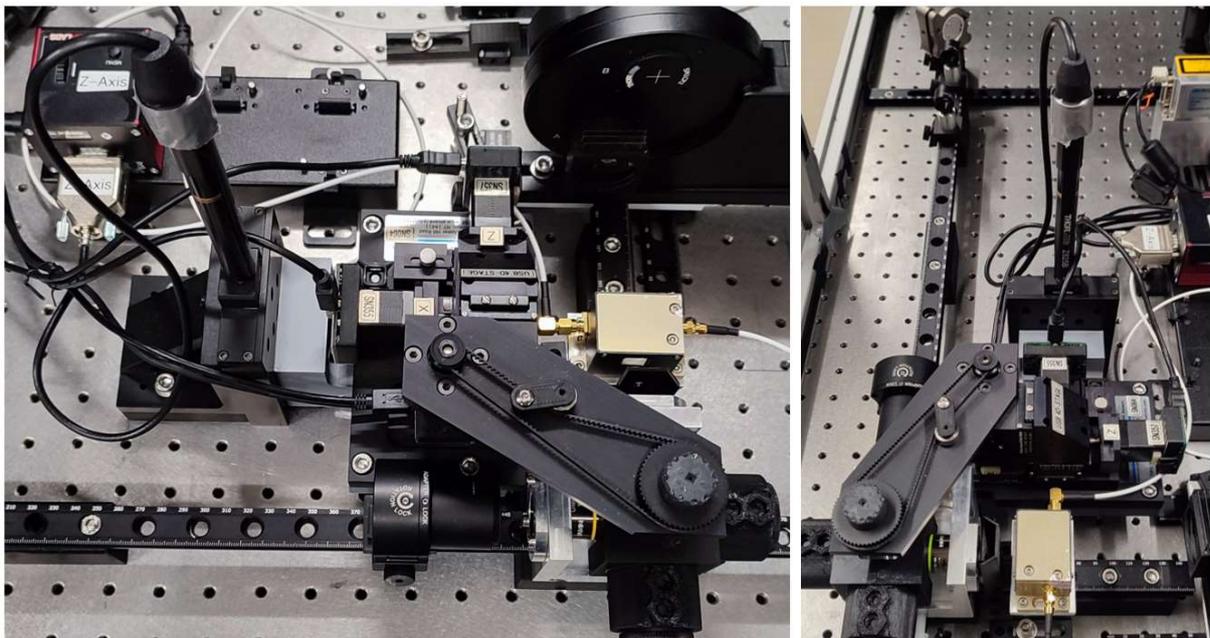


Abbildung 15: 4D-Verfahreinheit des LSRM bestehend aus den drei Komponenten USB-4D-Tisch, PT1-Z8-Achse und Kopplung aus dem 3D-Drucker.

2.2.4 Akusto-optisch durchstimmbare Filter

Eine weitere wichtige Komponente des LSRM ist ein akusto-optischer durchstimmbare Filter (AOTF) der Firma Brimrose Corp. (USA). Der AOTF ist ein elektro-optisches Halbleiterbauteil, das keine mechanisch beweglichen Teile enthält und als elektronisch durchstimmbare spektrale Bandpassfilter funktioniert.¹³² Im Inneren des AOTF befindet sich ein Kristall, der durch hochfrequente akustische (Schall-)Wellen in Schwingung versetzt wird. Diese Schwingungen ermöglichen die selektive Auswahl einzelner Wellenlängen aus dem

breitbandigen Licht der zu untersuchenden Probe. Dabei ist die Wellenlänge λ des selektierten Lichts eine Funktion der angelegten Hochfrequenz am Kristall.¹³²

$$\lambda = \Delta n \cdot \alpha \cdot \frac{V_a}{f_a} \quad (22)$$

Hierbei ist Δn die Doppelbrechung des Kristallmaterials, α stellt einen komplexen Parameter abhängig von Design des AOTFs dar, V_a ist die Geschwindigkeit der anregenden Schallwelle und f_a gibt die Frequenz der anregenden Schallwelle an.

Im Inneren des verwendeten AOTFs ist ein Telluriumdioxid (TeO_2)-Kristall, der in einer nicht kollinearen Konfiguration arbeitet.¹³² Dies bedeutet, dass sich die optischen und akustischen Wellen mit unterschiedlichen Winkeln im Kristall ausbreiten. Die Schwingungen im Kristall entsprechen der Frequenz der angelegten Hochfrequenzwellen und resultieren darin, dass sich das kristalline Gitter alternierend entspannt und komprimiert. Die so entstehenden Brechungsindexvariationen bewirken, wie bei einem klassischen Transmissionsbeugungsgitter, dass das Licht gebeugt wird. Da die Vibrationen jedoch das gesamte Volumen des Kristalls betreffen und nicht, wie bei klassischen Gittern nur die Oberfläche,¹⁴³ bricht der AOTF nur eine spezifische Wellenlänge und wirkt daher mehr wie ein Filter.^{132,144} Die Beugungseffizienz DE des AOTFs berechnet sich wie folgt und ist abhängig von der Beleuchtungsintensität:¹³²

$$DE(\%) = \frac{I - I_s}{I_0} \cdot 100 \% \quad (23)$$

I gibt die Intensität des angelenkten Lichts an, I_s steht für die Streulichtintensität und I_0 für die Beleuchtungsintensität. In Abbildung 16 ist die schematisch dargestellte Funktionsweise des AOTFs zu sehen. Über einen akustischen Wandler, der elektrische Signale in akustische umwandelt, wird der Kristall in Schwingung versetzt. Der schwingende Kristall bricht das einkommende Licht entsprechend den vorgegebenen Spezifikationen in zwei Strahlen erster Ordnung.¹⁴⁵ Die Polarisation der beiden Strahlen ist orthogonal zueinander. Durch die Schwingungen des Kristalls ändert sich die Polarisation des zu selektierenden Wellenlängenbereichs. Entsprechend der Polarisation des einfallenden Lichts, wird der jeweils zugehörige Strahlengang erster Ordnung ausgewählt. Die Winkel der beiden Strahlen sind abhängig von der Kristallgeometrie, unterscheidet sich normalerweise jedoch nur um wenige Grad.¹³² Das ungebrochene breitbandige Licht der nullten Ordnung passiert den AOTF auf linearem Weg. Für den Einsatz im LSRM wird dieser Lichtweg blockiert.

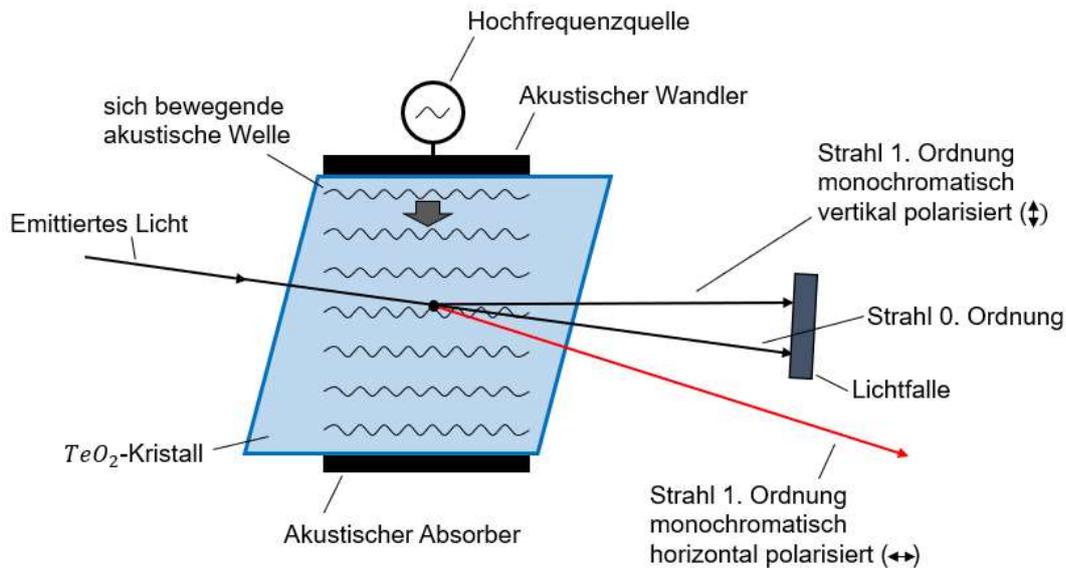


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines nicht kollinearen AOTFs.¹³²

Die entscheidenden Parameter des AOTFs sind zum einen die optische Apertur, die den Öffnungsschlitz des AOTFs angibt, sowie der Trennungswinkel, der den Abstand der einzelnen Strahlengänge zueinander beziffert. Die Bandbreite des AOTFs variiert je nach beobachteter Wellenlänge. Auch die standardmäßige Polarisation spielt bei der Verwendung des AOTFs eine Rolle. Alle Parameter sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Technische Parameter des verwendeten AOTFs.^{132,146}

Merkmale	AOTF
Hersteller	Brimrose Corp., USA
Modell	TEAF7-0.55-1.0-MSD
Bandbreite	550 – 1000 nm
Kristall-Substrat	TeO_2
Optische Apertur	7 x 7 mm
Winkelapertur	5 – 7°
Trennungswinkel: Input zu 1. Ordnung	2,8°
0. zu 1. Ordnung	6,4 – 7°
Spektrale Auflösung pro Wellenlänge	2,2 nm @ 589 nm 2,7 nm @ 633 nm 7,6 nm @ 1060 nm
Wellenfrontverzerrung	$\lambda/10$
Polarisation – Eingang	Vertikal
Polarisation - Eingang	Horizontal

Der AOTF wird über eine USB-Schnittstelle mit dem PC verbunden und mit der vom Hersteller

in C++ entwickelten Software (DS-1 Driver Control) angesteuert, dargestellt in Abbildung 17.¹³² Die Systemsprache ist englisch und ist nur kompatibel mit englischen Computersystemen.

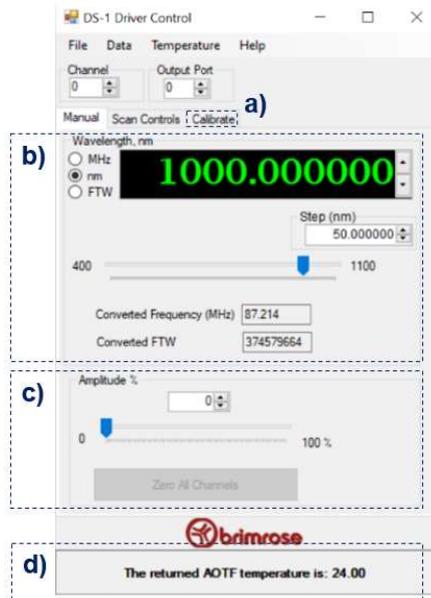


Abbildung 17: Betriebssoftware des AOTFs mit den Bereichen a) Kalibrierung, b) Filtereinstellungen, c) Leistungseinstellungen und d) Überwachung.¹³²

Bereich a) der Software kalibriert den AOTF. Es wird ein automatisches Kalibrierungsprogramm durchgeführt, welches den AOTF über die ganze Bandbreite kalibriert. Die zugehörige Kalibrierungskurve wird vom Hersteller individuell für jeden AOTF zu der Software beigelegt und liegt als digitale Datei bei. Die Einstellungen der zu selektierenden Wellenlänge wird in Bereich b) im „Manual Mode“ vorgenommen. Dies ist der standardmäßige Betriebsmodus, nachdem das Programm gestartet ist. Die zu vermessende Wellenlänge wird hier vom Benutzer über eine Direkteingabe per Keyboard oder per Betätigung der Pfeilfelder auf der rechten Seite des Displays ausgewählt. Dieselbe Funktion kann auch über die Frequenzeinstellungen in MHz oder über den Integer FTW (frequency tuning word) erfolgen. Digitale Anzeigen rechnen automatisch den gewünschten Wert in alle anderen Parameter um. Bereich c) aktiviert den AOTF und gibt die Höhe der Amplitude der Hochfrequenzspannung an. Je höher die Amplitude, desto stärker sind die Schwingungen des Kristalls, desto effizienter ist die Filterfunktion. Mit der Funktion „Zero all Channels“ reduziert die Amplitude auf null. Zur Überwachung der Temperatur des Kristalls, der sich durch die Schwingungen aufheizt, ist in Bereich d) die digitale Anzeige eines im AOTF verbauten Temperatursensors dargestellt. Neben der Temperatur des AOTFs wird auch die Temperatur des beiliegenden Treibers gemessen. Der Treiber erzeugt die Hochfrequenzwelle. Die Temperaturen werden kontinuierlich gemessen. Bei Überschreiten der Grenztemperatur von 60° C schaltet sich der AOTF automatisch ab.

2.2.5 Kamera

Die verwendete Kamera von Typ Orca Flash 4.0 LT+ von Hamamatsu zeichnet sich durch eine schnelle Bildaufnahme von bis zu 25.655 Bilder pro Sekunde sowie einer schnellen Datenübertragung aus.¹³³ Durch die kompakte quadratische Bauform mit den entsprechenden geometrischen Vorgaben ist eine Integration in den Aufbau problemlos möglich. Zudem weist die Kamera eine hohe Quanteneffizienz im Arbeitsbereich des LSM auf, wie aus Abbildung 18 zu entnehmen ist. Da die zu detektierenden Signale sehr gering sind, ist ein möglichst hoher Wirkungsgrad der Detektionsseite maßgeblich für den Erfolg des Systems.

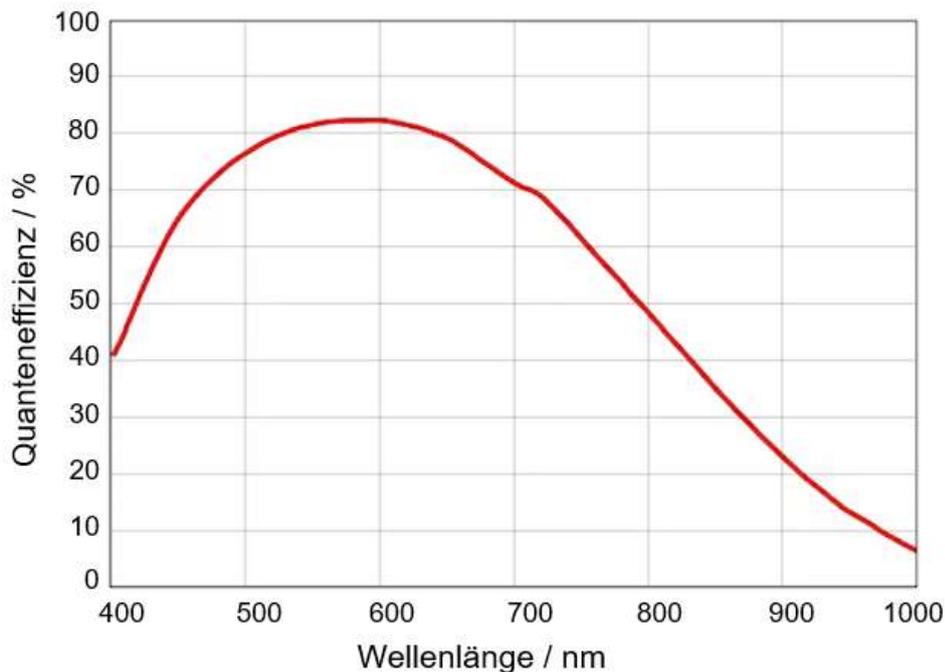


Abbildung 18: Quanteneffizienz der verwendeten sCMOS-Kamera Orca Flash 4.0 LT+ von Hamamatsu.¹³³

Die Quanteneffizienz bei den Anregungswellenlängen der Laser beträgt bei Laser 1 (785 nm) 54 % und bei Laser 2 (660 nm) 78 % und stellt im Vergleich zu gleichwertigen Kameraalternativen die beste Option dar.¹⁴⁷ Der Kamerachip ist mit 2048 x 2048 Pixel bestückt bei einer Pixelgröße von 6,5 x 6,5 μm . Mit der kamerainternen Binning-Methode wird die Empfindlichkeit, das Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio, SNR) und die Bildrate erhöht. Hierbei addieren sich die Signale benachbarter Pixel zusammen. Nachteilig ist jedoch, dass die Auflösung der Kamera reduziert wird.¹⁴⁸ Bei der Anwendung im LSM findet ein Binning von 2 x 2 Pixeln statt, dass die Auflösung der Kamera auf 1024 x 1024 Pixel reduziert, die Empfindlichkeit aber vervierfacht und das SNR verdoppelt. Die virtuelle Pixelfläche verdoppelt sich auf 13 x 13 μm .

2.2.6 Spektrometer und Messbereiche der Laser

Für die spektrometrische Auswertung wird das Spektrometer MultiSpec®Raman der Tec5 AG eingesetzt. Die Anregungswellenlänge beträgt 785 nm und entspricht der Wellenlänge von Laser 1, mit dem das Spektrometer problemlos betrieben werden kann. Das Spektrometer dient dem Nachweis der Raman-Signale, die sowohl mit Laser 1 als auch mit Laser 2 erzeugt werden. Die aufgenommenen Bilder werden mit den Raman-Spektren verglichen, um die Signalbanden eindeutig zu identifizieren. Eine Besonderheit ergibt sich bei der Betrachtung der Raman-Signale von Laser 2, da dessen Anregungswellenlänge von 660 nm nicht den Spezifikationen des Spektrometers entspricht. Daher kann nur ein Teilbereich der Signale betrachtet werden. In Abbildung 19 wird veranschaulicht, welche Signale mit dem Spektrometer bei Verwendung von Laser 2 erfasst werden können und wie sich die Signale überlagern.

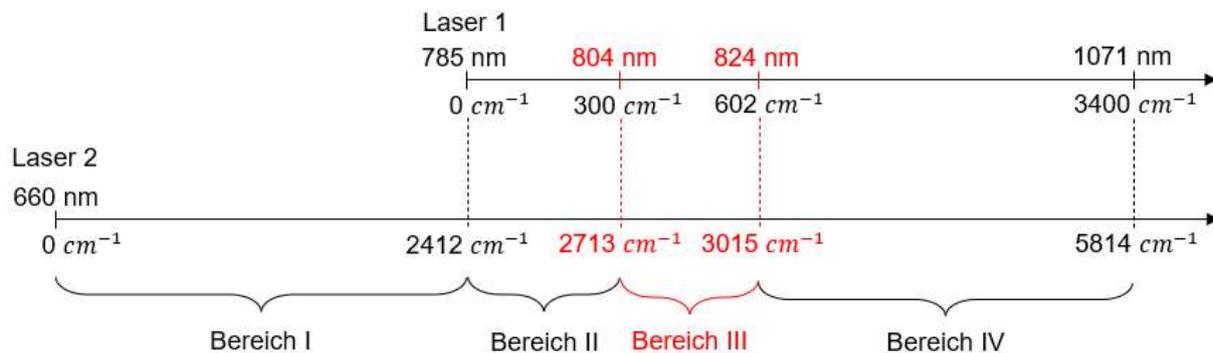


Abbildung 19: Spektralbereiche beider Laser, die mit dem Spektrometer von Tec5 dargestellt werden. Der rot markierte Bereich ist der für die Anwendung des LSRM relevante Messbereich für Raman-Messungen mit Laser 2.

Das Raman-Spektrum beider Laser in Kombination mit dem Spektrometer ist in vier unterschiedliche Bereiche gegliedert, deren Messaufgabe im Raman-Bereich an die Funktionalität des Spektrometers gekoppelt ist. In Bereich I ist Laser 2 aktiv und kann entsprechend der Spezifikation der jeweiligen Messung Messdaten produzieren. Allerdings besteht hier aufgrund der mangelnden Spektrometerkompatibilität keine Möglichkeit, die Signale spektrometrisch mit einer hohen und damit für den Raman-Bereich geeigneten Auflösung zu verifizieren. Aufgrund eines im Spektrometer integrierten Langpassfilter und einer softwareseitig gesteuerten Filterfunktion ist die Erzeugung von Spektren in Bereich II ebenfalls nicht möglich. Hier wird durch die beschriebenen Maßnahmen ein Übersteuern der Zeile durch eine zu hohe Laserintensität und damit eine Beschädigung des Detektors vermieden. Relevant für das LSRM ist jedoch Bereich III. In diesem können Spektralinformationen von Laser 2 aufgenommen werden in einem Bereich zwischen 2713 cm^{-1} und 3015 cm^{-1} und damit der relevanten C-H-Molekülstretschwingung für biologische Proben.¹⁴⁹ Die Messsignale von Laser 2 erscheinen in der digitalen Darstellung des Spektrometers an den Positionen 300 cm^{-1} bis 602 cm^{-1} . Eine Umrechnung der Skala ist unumgänglich. Auf diese Weise lassen sich auch längerwellige Bereiche im Raman-Spektrum nachweisen, was

in Bereich IV dargestellt ist. Bis zu einer Wellenlänge von 1071 nm bzw. einem Raman-Shift von 3400 cm^{-1} bezogen auf Laser 1 ist das Spektrometer in seinem Arbeitsbereich und es lassen sich Signale nachweisen, wie z.B. eine Wasserverteilung innerhalb der Probe.¹⁵⁰ Der Bereich überhalb von 3400 cm^{-1} ist jedoch für die Raman-Messungen mit dem LSRM aktuell nicht relevant.

Das Spektrometer wird über eine Software namens *Multispec Pro II* betrieben. Die GUI der Software ist in Abbildung 20 dargestellt. Die GUI ist übersichtlich gestaltet und ermöglicht das Darstellen der akquirierten Spektren in einem großen Teil des Fensters. Die Messdaten werden als vollständiges Spektrum über den vollständigen Arbeitsbereich des Spektrometers dargestellt. Eine integrierte Zoom-Funktion ermöglicht die vergrößerte Darstellung relevanter Messsignale.

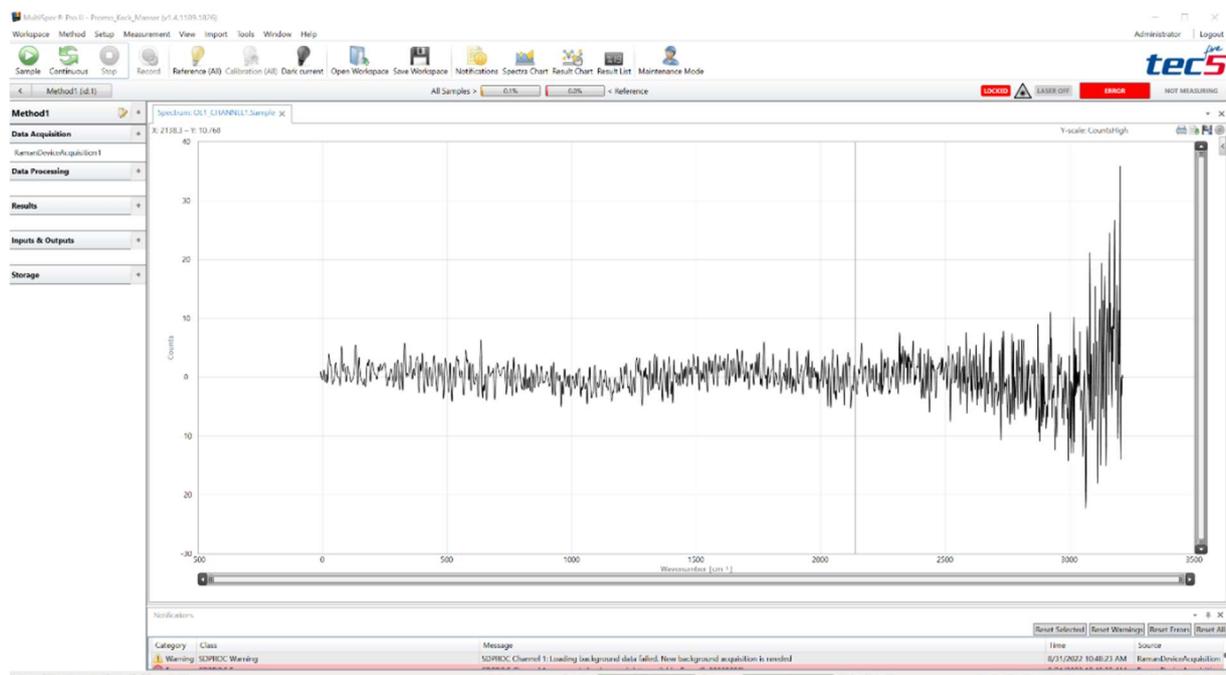


Abbildung 20: Benutzeroberfläche der Spektrometersoftware Multispec Pro II der Tec5 AG.¹⁵¹

Vor jeder Messung im LSRM ist es erforderlich, einen speziellen Workspace zu laden, der alle erforderlichen Spezifikationen enthält. Dieser Workspace muss bei jedem Neustart der Messsoftware erneut geladen werden. Über ein Pop-Up-Menü können die wichtigsten Parameter aufgerufen und angepasst werden, darunter die Integrationszeit, die Anzahl der Akkumulationen und der Speicherort für die Messdaten. Es besteht auch die Möglichkeit, eine Messreihe zu konfigurieren und zu starten. Zusätzlich zur Aufnahme der eigentlichen Messdaten wird das Hintergrundsignal erfasst, indem das Hintergrundlicht in der Messkammer aufgenommen wird, wenn der Laser ausgeschaltet ist. Das aufgenommene Hintergrundsignal wird automatisch gespeichert und bei den eigentlichen Messungen von den Messsignalen subtrahiert, um ein bereinigtes Messsignal zu erhalten. Die Rohdaten der Messungen und das Dunkelstromsignal können unabhängig voneinander gespeichert und archiviert werden. Das

Spektrometer im LSM verfügt über einen integrierten Laser mit einer Wellenlänge von 785 nm, der über die Software gesteuert und überwacht wird. Bei der Anwendung des LSM wird der Laser jedoch nicht benötigt, weshalb die sicherheitsrelevanten Aspekte der Software entfallen.

2.3 Probenauswahl und -präparation

In diesem Kapitel liegt der Fokus auf der geeigneten Auswahl und Vorbereitung der Proben für die Vermessung im LSM. Es werden verschiedene Aspekte behandelt, die bei der Auswahl der Proben von Bedeutung sind, wie beispielsweise die Art der Probe und ihre biologischen Eigenschaften. Zudem werden die Methoden der Probenvorbereitung und -fixierung erläutert, um sicherzustellen, dass die Proben optimal für die Messung im LSM vorbereitet sind. Durch die detaillierte Darstellung dieser Schritte wird ein Verständnis für die Bedeutung einer korrekten Probenauswahl und -präparation im Kontext des LSM vermittelt und trägt dazu bei, qualitativ hochwertige und aussagekräftige Messergebnisse zu erzielen.

Probenauswahl

Als geeignete Proben haben sich HT29-Zellen, eine etablierte Kolonkarzinom-Zelllinie, in Verbindung mit Fibroblasten herausgestellt.¹⁵²⁻¹⁵⁴ HT29-Zellen eignen sich aufgrund ihrer Fähigkeit, Sphäroide zu bilden, und der Möglichkeit, sie mit Fibroblasten zu kultivieren, für die Anwendung im LSM.¹⁵⁵ Die Sphäroidbildung ermöglicht die Schaffung drei-dimensionaler Zellstrukturen, die den physiologischen Bedingungen von In-vivo-Tumorgewebe besser entsprechen. Dies ermöglicht eine bessere Modellierung der Mikroumgebung des Tumors und eine realistischere Darstellung der Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Stromagewebe. Die Einbeziehung von Fibroblasten in die Co-Kultur schafft ein relevantes Modell für die Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen. Fibroblasten haben die Fähigkeit, die Mikroumgebung des Tumors zu modulieren und können die Tumorentwicklung sowohl fördern als auch hemmen.¹⁵⁶ Mit Hilfe des LSM können die räumliche Anordnung der Tumorzellen und Fibroblasten sichtbar gemacht und analysiert werden.

Die Verwendung von HT29-Zellen und Fibroblasten in der Lichtblattmikroskopie wird durch die Kompatibilität mit gängigen Kulturmedien wie McCoy's 5A Medium^{157,158} und Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)^{159,160} unterstützt. Diese Medien bieten eine angemessene Versorgung mit Nährstoffen und ermöglichen das Wachstum und die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen während der Kultivierung. Aufgrund ihrer Etablierung als standardisierte Zelllinien und ihrer umfangreichen Forschung sind HT29-Zellen und Fibroblasten gut charakterisiert und leicht verfügbar.¹⁶¹⁻¹⁶³ Diese Aspekte tragen zur Reproduzierbarkeit von Experimenten bei und ermöglichen den Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Studien.

Probenpräparation

Um Sphäroide in Mono- und Co-Kulturen herzustellen, werden Zellen in einer geeigneten Anzahl auf 96-Well-ULA-Platten von Corning platziert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation der Platten für 2 Minuten bei einer Zentrifugalkraft von 20 g, um sicherzustellen, dass die Zellen gleichmäßig verteilt sind. Die Zellen werden dann in einem Inkubator mit einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem CO_2 -Gehalt von 5 % gehalten. Der Inkubationsprozess erstreckt sich über einen Zeitraum von 3 Tagen.

Für die Kultivierung der HT-29-Kolonkrebiszellen von ATCC wird McCoy's 5A-Medium von Capricorn verwendet. Eine Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) gewährleistet optimale Wachstumsbedingungen. Um Sphäroide zu bilden, werden die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in einer Konzentration von $1 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung auf die ULA-Platten mit 96 Vertiefungen ausgesät. Durch die dreitägige Kultivierung erreichen die Sphäroide einen Durchmesser von etwa 400 μm . Für die Kultivierung der CCD-1137SK-Fibroblastenzellen aus menschlicher Vorhaut von ATCC findet Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) von Capricorn Anwendung. Auch dieses Medium erhält eine Zugabe von 10 % FBS und 1 % Pen/Strep. Die Fibroblastenzellen werden mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung auf die ULA-Platten mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen erreichen die Sphäroide eine ähnliche Größe.

Für die Co-Kultivierung erfolgt das Mischen der HT29-Tumorzellen im Verhältnis 1:5 mit den CCD-1137SK-Fibroblasten. Das bedeutet, dass jede Vertiefung der ULA-Platten mit 96 Vertiefungen $5 \cdot 10^2$ Tumorzellen mit $2,5 \cdot 10^3$ Fibroblasten enthält. Die Co-Kultur wird ebenfalls für 3 Tage in Anwesenheit des entsprechenden Mediums kultiviert.

Nach der Herstellung der Sphäroide erfolgt die Einbettung in einer 2%igen Agarose-Lösung. Diese Lösung besteht aus 2 Gewichtsprozent (w%) Agarose, die mit einer FBS-Wasserlösung gemischt wird. Die Einbettung von Sphäroiden in Agarose-Gel ist eine gängige Methode, um dreidimensionale Zellstrukturen für die Lichtscheibenmikroskopie zu präparieren.^{164,165} Dabei werden die Sphäroide in eine Agarose-Lösung suspendiert und diese Mischung in eine Form oder ein Gefäß gegossen, in dem sie aushärtet und ein stabiles Gel bildet. Das Agarose-Gel bietet eine mechanische Unterstützung für die Sphäroide und ermöglicht ihre räumliche Anordnung während der Bildgebung. Es schafft eine dreidimensionale Matrix, in der die Zellen wachsen und sich weiterentwickeln können. Durch die Verwendung von Agarose-Gel wird außerdem das Ausfransen der Sphäroide verhindert und ihre Integrität während des Bildgebungsvorgangs gewährleistet. Die Einbettung der Sphäroide in Agarose-Gel erlaubt eine präzise Positionierung und Ausrichtung der Proben im LSM. Dies ermöglicht die Erfassung detaillierter Bilder und die Analyse der dreidimensionalen Struktur der Sphäroide. Darüber hinaus bietet das Agarose-Gel eine geeignete Umgebung für die Durchführung von

weiteren experimentellen Manipulationen, wie die Zugabe von Testsubstanzen oder geeigneter Farbstoffe zur Darstellung von Zellorganellen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Agarose-Gel liegt darin, dass es im relevanten Bereich der Raman-Messungen keine störenden Signale erzeugt. Durch die Verwendung von Agarose-Gel als Einbettungsmedium bleiben die Raman-Signale der Proben unverfälscht und ermöglichen präzise und zuverlässige Messungen. Um diese Aussage zu unterstützen, wird eine Messung mit dem Spektrometer MultiSpec®Raman von Tec5 durchgeführt. Die Laserleistung beträgt 100 mW und die Integrationszeit 500 ms. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

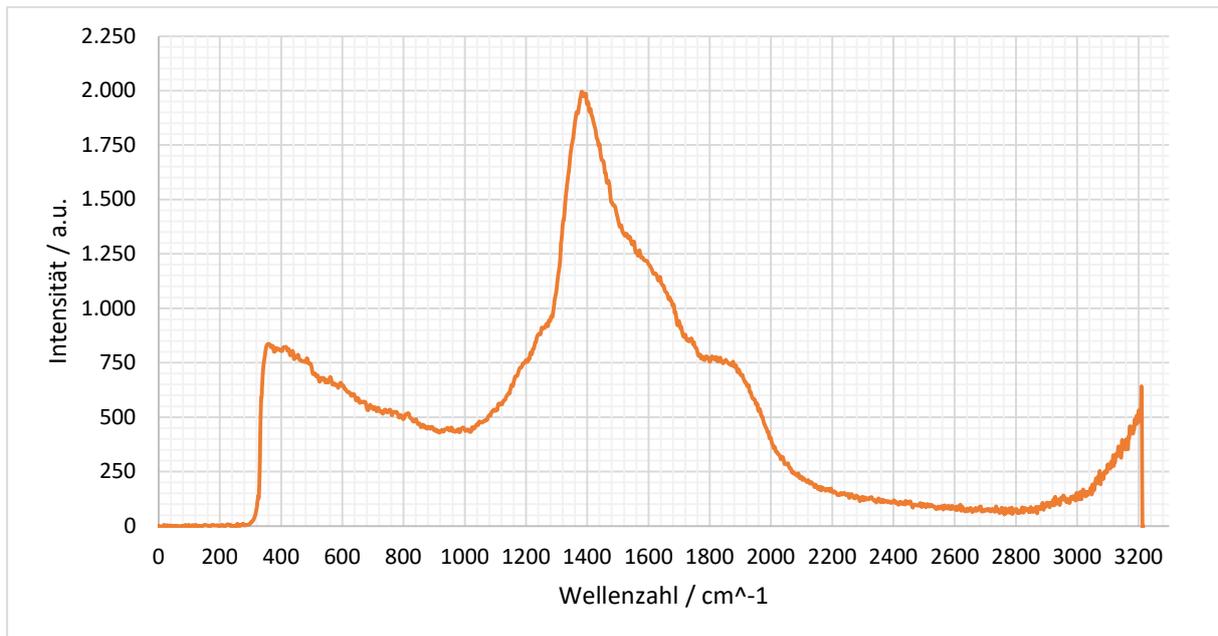


Abbildung 21: Raman-Spektrum eines 2%-Agarose-Gel ohne Sphäroid. Die Laserleistung ist auf 100 mW eingestellt. Die Integrationszeit beträgt 500 ms.

Die Messung zeigt, dass das Agarose-Gel keine störenden Signale im relevanten Raman-Bereich zwischen 2713 und 3015 cm^{-1} erzeugt, was die Eignung dieses Einbettungsmediums für Raman-Analysen mit dem LSRM bestätigt. Im Bereich zwischen 1200 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} ist ein Agarose-Peak zu sehen, der Einfluss auf die Fluoreszenz-Messungen haben kann. Da die Autofluoreszenz jedoch sehr stark ausgebildet ist, ist ein Einfluss von Agarose-Gel auf die Bildgebung und Spektren zu vernachlässigen. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass das Agarose-Gel die Raman-Signale abschwächen kann, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen oder schwachen Signalen. In solchen Fällen kann eine geeignete Kompensation erforderlich sein, um genaue Messergebnisse zu erhalten.

Zu Beginn der Einbettung der Sphäroide in das Agarose-Gel stellte sich heraus, dass die ursprünglichen Ansätze zur Probenbefestigung mit Kapillaren¹²⁶, die im Grundmodell des OpenSPIM-Aufbaus vorgesehen sind, nicht ausreichend waren. Bei der Durchführung erster Experimente variierten die lokalen Bedingungen der Probenoberflächen der Glaskapillaren.

Zur Überwindung dieser Herausforderungen gibt es einen innovativer Ansatz.¹²⁷ Ein länglicher Träger beinhaltet eine quaderförmige Gelkammer mit einem Volumen von 90 mm^3 . Diese Gelkammer ist an einer zylindrischen Verlängerung befestigt, die wiederum durch einen elastischen Ring in der Rotationsachse der Verfahreinheit befestigt ist. Durch diese Konstruktion ist es möglich, die Positionierung der Probe in mehreren Ansichten zu ermöglichen. Um die Probe aufzunehmen, wird der Träger in einen entsprechenden Rahmen eingesetzt. In einem weiteren Schritt wird ein negativer Abstandshalter in Form eines asymmetrischen Kegelstumpfs verwendet. Dieser wird auf den Rahmen gesetzt, nachdem Träger platziert ist. Der Probenhalter, der Rahmen sowie der Abstandshalter sind in Abbildung 22 dargestellt.

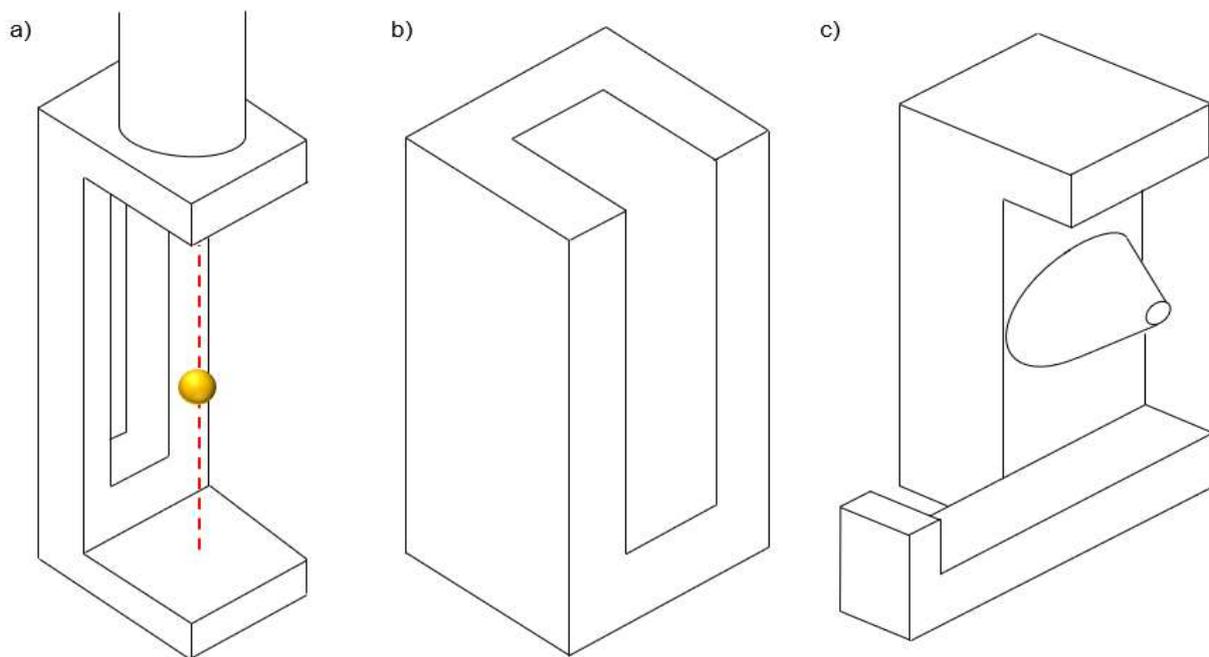


Abbildung 22: Schematische Darstellung des a) Probenhalters mit gelb dargestellter Probe (zur Veranschaulichung der Position innerhalb des Probenhalters), b) des dazugehörigen Rahmens sowie c) eines negativen Abstandshalters zur Herstellung von Sphäroiden in Hydrogelen.¹²⁷

Nachdem das Gel eine feste Konsistenz erreicht hat, entsteht eine trichterförmige Gelstruktur. Diese trichterförmige Struktur erstreckt sich entlang der Mittellinie der zylindrischen Verlängerung und ermöglicht die Platzierung der Sphäroide entlang der Rotationsachse des Positionierungssystems. Die Sphäroide werden vorsichtig mit einer Pipette in den Geltrichter überführt. Dabei wird überschüssige Pufferlösung entfernt, um eine präzise Einbettung der Sphäroide zu gewährleisten. Dieser Prozess ermöglicht die gleichmäßige Positionierung der Sphäroide im Gel. Durch die Einführung des länglichen Trägers mit der quaderförmigen Gelkammer und des negativen Abstandshalters wird eine verbesserte Stabilität und Kontrolle der Probenpositionierung erreicht. Das Problem der örtlichen Variationen der Proben bei unterschiedlichen Modellen wird minimiert, da die Proben nun in einer standardisierten und

definierten Umgebung platziert werden können. Zudem wird das Anhaften von Sphäroiden an den Glasoberflächen vermieden, was zu genaueren und zuverlässigeren Messungen führt. Diese Lösung bietet eine effektive Methode zur sicheren und reproduzierbaren Befestigung von Proben im LSRM. Durch die Verwendung des länglichen Trägers mit der quaderförmigen Gelkammer wird eine verbesserte Handhabung der Proben ermöglicht und potenzielle Probleme im Zusammenhang mit Materialanhaftungen und lokalen Variationen der Proben werden effektiv gelöst.

2.4 Messmethodik und -modalitäten

Bei der Datenaufnahme werden zunächst die unpräparierten Sphäroide unter einem Mikroskop platziert und mit geringer Leistung vermessen. Dies dient der Erfassung der Rayleigh-Streuung und ermöglicht die Beurteilung der morphologischen Strukturen der Sphäroide sowie eine erste Qualitätskontrolle. Die Auswahl des Lasers erfolgt abhängig von der zu untersuchenden Zellkombination. Die Laserleistung beträgt in beiden Fällen 1 mW, und die Integrationszeit beträgt 100 ms. Der AOTF wird entsprechend auf die Laserwellenlänge eingestellt. Die Aufnahmen werden mittels einer Kamera durchgeführt.

Anschließend wird das System für die Fluoreszenz-Spektroskopie umgerüstet. Die Sphäroide werden je nach verwendeter Zellkultur mit einem der beiden Laser vermessen. Die Laserleistung hängt von dem spezifischen Laser ab und kann entweder 200 mW für Laser 1 (785 nm) oder 130 mW für Laser 2 (660 nm) betragen. Die Integrationszeit wird auf 2000 ms festgelegt. Die detektierte Wellenlänge variiert abhängig von den zu analysierenden Substanzen und der gewählten Laserkonfiguration. Nach der Aufnahme mit der Kamera wird das Gerät auf den spektroskopischen Anschluss umgebaut und Aufnahmen der einzelnen Einstellungen erneut mit dem Spektrometer aufgenommen.

Nach Abschluss der Fluoreszenz-Messungen folgen Raman-Messungen. Diese Reihenfolge beruht auf der geringen phototoxischen Wirkung auf die Raman-Messungen im Vergleich zu den Fluoreszenz-Messungen. Die Laserleistungen werden erneut an die verwendeten Laser angepasst und betragen entweder 200 mW oder 130 mW. Die Integrationszeit für die Raman-Messungen beträgt in beiden Fällen 5000 ms. Die Einstellungen des AOTFs richten sich nach den zu analysierenden Raman-Banden und dem ausgewählten Laser. Eine Zusammenfassung der einzelnen Messmodalitäten mit den diversen Einstellmöglichkeiten ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Messmodalitäten des LSM mit spezifischen Einstellungen.¹²⁷

Nr.	Modalität	λ Laser	Lichtleistung	Integrationszeit	Detektierte zentrale Wellenlänge/ Wellenzahl	Spektrum
1	Rayleigh	785 nm	1 mW	100 ms	785 nm/ 0 cm^{-1}	Nein
2	Rayleigh	660 nm	1 mW	100 ms	660 nm/ 0 cm^{-1}	Nein
3	Fluoreszenz	785 nm	200 mW	2000 ms	817 nm/ 500 cm^{-1}	Ja
4	Fluoreszenz	785 nm	200 mW	2000 ms	834 nm/ 750 cm^{-1}	Ja
5	Fluoreszenz	785 nm	200 mW	2000 ms	852 nm/ 1000 cm^{-1}	Ja
6	Fluoreszenz	660 nm	130 mW	2000 ms	683 nm/ 500 cm^{-1}	Nein
7	Fluoreszenz	660 nm	130 mW	2000 ms	694 nm/ 750 cm^{-1}	Nein
8	Fluoreszenz	660 nm	130 mW	2000 ms	707 nm/ 1000 cm^{-1}	Nein
9	Raman	785 nm	200 mW	5000 ms	1017 nm/ 2900 cm^{-1}	Ja
10	Raman	785 nm	200 mW	5000 ms	890 nm/ 1500 cm^{-1}	Ja
11	Raman	660 nm	130 mW	5000 ms	817 nm/ 2900 cm^{-1}	Ja
12	Raman	660 nm	130 mW	5000 ms	732 nm/ 1500 cm^{-1}	Nein

Nach der Erfassung der Bilder und Spektren werden verschiedene Schritte der Datenverarbeitung und -analyse durchgeführt. Zunächst werden die erzeugten Bilder mit den entsprechenden Spektren in einer speziell entwickelten Python-Software verrechnet. Dies ermöglicht eine räumliche Zuordnung der spektralen Informationen zu den Bildpunkten und erzeugt ein korreliertes Bild-Spektren-Paar für jede Modalität. Um die Qualität der Bilder zu verbessern, werden verschiedene Bildverarbeitungstechniken angewendet. Die Kontrastanpassung wird verwendet, um den Dynamikbereich der Pixelintensitäten zu optimieren und eine bessere Visualisierung der Strukturen zu ermöglichen. Dabei wird die Skalierung der Pixelwerte anhand der spektralen Informationen vorgenommen, wobei der höchste Raman-Peak als Referenz verwendet wird. Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, werden spezielle Filter angewendet. Diese Filtertechniken zielen darauf ab, unerwünschte Signalbeiträge außerhalb der interessierenden Regionen zu eliminieren. Die Raman-Spektren werden geglättet, um das Rauschen weiter zu reduzieren. Hierbei kommt der Savitzky-Golay-Filter zum Einsatz, der eine effektive Methode zur Signalglättung darstellt.^{166,167} Dieser Filter basiert auf einer Polynomannäherung dritter Ordnung und einer Fenstergröße von 110 cm^{-1} , die auf den relevanten Spektralbereich angewendet wird. Die Glättung der Raman-Spektren verbessert die Datenqualität und erleichtert die nachfolgende Auswertung. Schließlich werden die verarbeiteten Bilder mit einer selbstgeschriebenen Python-Software in einer dreidimensionalen Darstellung visualisiert. Diese Darstellung ermöglicht eine räumliche Betrachtung des Sphäroids und bietet eine umfassende visuelle Darstellung der morphologischen Strukturen sowie der Verteilung der analysierten Substanzen.

Die kombinierte Anwendung der Bildverarbeitungstechniken und der spektralen Analyse ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Sphäroide und liefert wichtige Informationen über

ihre strukturellen Eigenschaften und chemischen Komponenten. Dieser umfassende Ansatz trägt zur weiteren Erforschung und Charakterisierung von Sphäroiden bei und ermöglicht die Durchführung weiterer Analysen.

3 Ergebnisse

Das vorangegangene Kapitel beschreibt die technischen Grundlagen in Form von Auslegung und Entwicklung des LSRM sowie die Entwicklung der für die Bildgebung notwendige Probenpräparation und Messmethodik. Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit der technischen Umsetzung der entwickelten Grundlagen sowie der Abbildung mehrerer Abbildungsmodalitäten von dreidimensionalen Zellkulturen in einem digitalen 3D-Modell. In diesem Kapitel wird das Vorgehen zum Erreichen des Ziels in mehrere Teilschritte unterteilt:

- Technische Umsetzung des LSRM
- Software-Entwicklungen
- Bildaufnahme verschiedener Modalitäten anhand einer 3D-Zellkultur
- Darstellung der Resultate im 3D-Modell
- Vergleich mit Referenzgerät

Zur Validierung des Systems werden statistisch relevante Messungen durchgeführt und dargestellt. Die Ergebnisse der oben aufgeführten Schritte werden in den nachfolgenden Unterkapiteln detaillierter beschrieben.

3.1 Technische Umsetzung des LSRM

In diesem Kapitel wird die technische Umsetzung des LSRM beschrieben. Es werden die verschiedenen technischen Komponenten, die für den Aufbau des Systems verwendet werden, im Hinblick auf ihre Funktion und Leistung getestet und evaluiert. Durch diese Tests wird sichergestellt, dass jede Komponente ordnungsgemäß funktioniert und den Anforderungen des LSRM gerecht wird. Zudem werden potenzielle Probleme oder Limitierungen identifiziert. Die detaillierte Beschreibung der technischen Umsetzung und der Funktionstests ermöglicht ein besseres Verständnis der Arbeitsweise des LSRM und legt den Grundstein für zuverlässige und präzise Messungen in den nachfolgenden Kapiteln.

3.1.1 Sicherheitsrelevante Maßnahmen

Der technische Aufbau des LSRM erfolgt in einem Gehäuse aus Aluminium mit den Abmessungen 1000 x 900 x 800 mm. Die Innenflächen des Gehäuses sind mit schwarzem Lack behandelt. Durch die Beimischung von Holzspänen in den schwarzen Lack wird eine raue Oberfläche erzeugt, die das auftreffende Licht diffus streut. Um die Sicherheit zu gewährleisten, wurden spezielle Vorkehrungen getroffen. Die einzelnen Türen des Gehäuses sind mit Magnetfeldschaltern gesichert, die in eigens für diesen Zweck mittels 3D-Druck hergestellten Halterungen montiert sind. Diese Magnetfeldschalter sind mit den Interlocks

beider Laser verbunden. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Laser beim Öffnen der Türen automatisch deaktiviert werden. Zusätzlich wurden die Kanten der Türen mit Aluminiumblechen verlängert, um überlappende Kanten zu erzeugen, die das Austreten von Laserlicht aus dem Inneren des Gehäuses verhindern. Darüber hinaus wurden schwarzer Schaumstoff an den Scharnieren angebracht, um diesen Bereich vor dem Eindringen von Laserlicht zu schützen. Dank dieser sorgfältig umgesetzten Maßnahmen wird der technische Aufbau des LSRM gemäß den Bestimmungen in Laserschutzklasse 1 eingestuft. Dies bedeutet, dass bei ordnungsgemäßem Gebrauch des Geräts keine zusätzlichen Schutzmaßnahmen erforderlich sind. Im Vergleich zur ursprünglichen Klassifizierung der Laser als Laserschutzklasse 3b, was eine potenzielle Gefahr für Augen und Haut darstellt, bietet die Laserschutzklasse 1 ein deutlich höheres Maß an Sicherheit.¹⁶⁸ Die Abbildungen 23 und 24 veranschaulichen das Gehäuse des Lichtscheibenmikroskops sowie die Anbringung der Magnetschutzschalter, die eine wichtige Rolle bei der Gewährleistung der Sicherheit spielen.

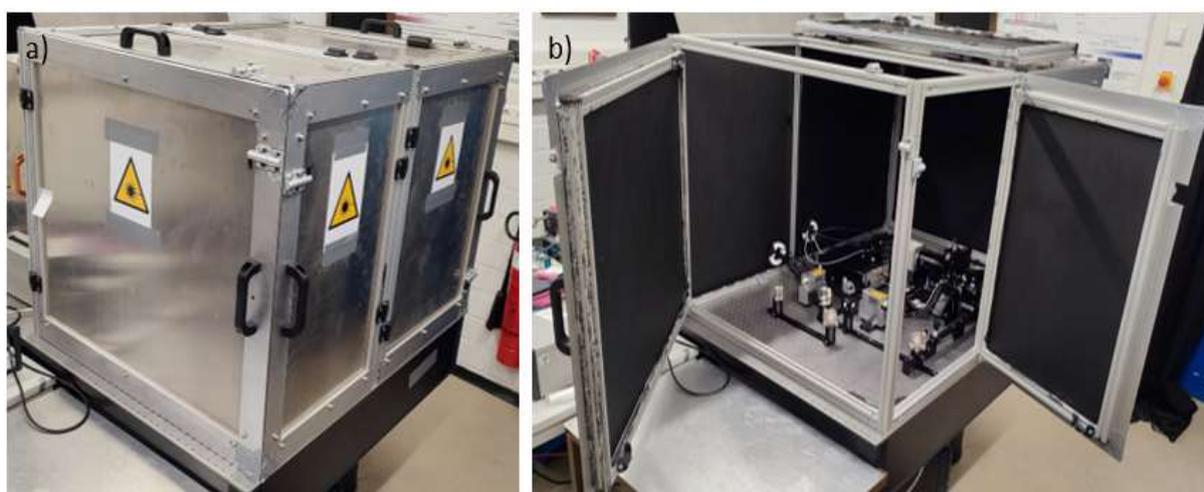


Abbildung 23: Schutzgehäuse des Lichtscheibenmikroskops mit a) geschlossenen und b) offenen Türen.



Abbildung 24: Magnetschutzschalter mit gedruckten Halterungen zum Personenschutz bei eingeschaltetem Laser.

3.1.2 Aufbau des LSRM

Der Aufbau des LSRM, theoretisch beschrieben in Kapitel 2.1 – *Grundlagen des technischen Aufbaus*, ist in Abbildung 25 zu sehen. Die Nummerierung entspricht der in Tabelle 4 aufgeführten Komponenten. Der gesamte Aufbau befindet sich auf einem pneumatisch betriebenen schwingungsgedämpften Tisch (RS1000™, Newport Corporation, USA), um Vibrationen der Umgebung und andere mechanische Störeinflüsse abzufangen, sodass die empfindlichen optischen Komponenten nicht beeinflusst werden. Die Lochplatte des Tisches hat ein 25 mm Loch-Raster, in dem sich M6-Gewinde befinden, die kompatibel zu den verwendeten Schwalbenschwanzschiene unterschiedlichster Länge (Dovetail Optical Rails, Thorlabs GmbH, Deutschland) sind. Individuell, mittels 3D-Druckverfahren hergestellte Abstandhalter bewirken, dass sich alle Komponenten auf derselben optischen Achse befinden.

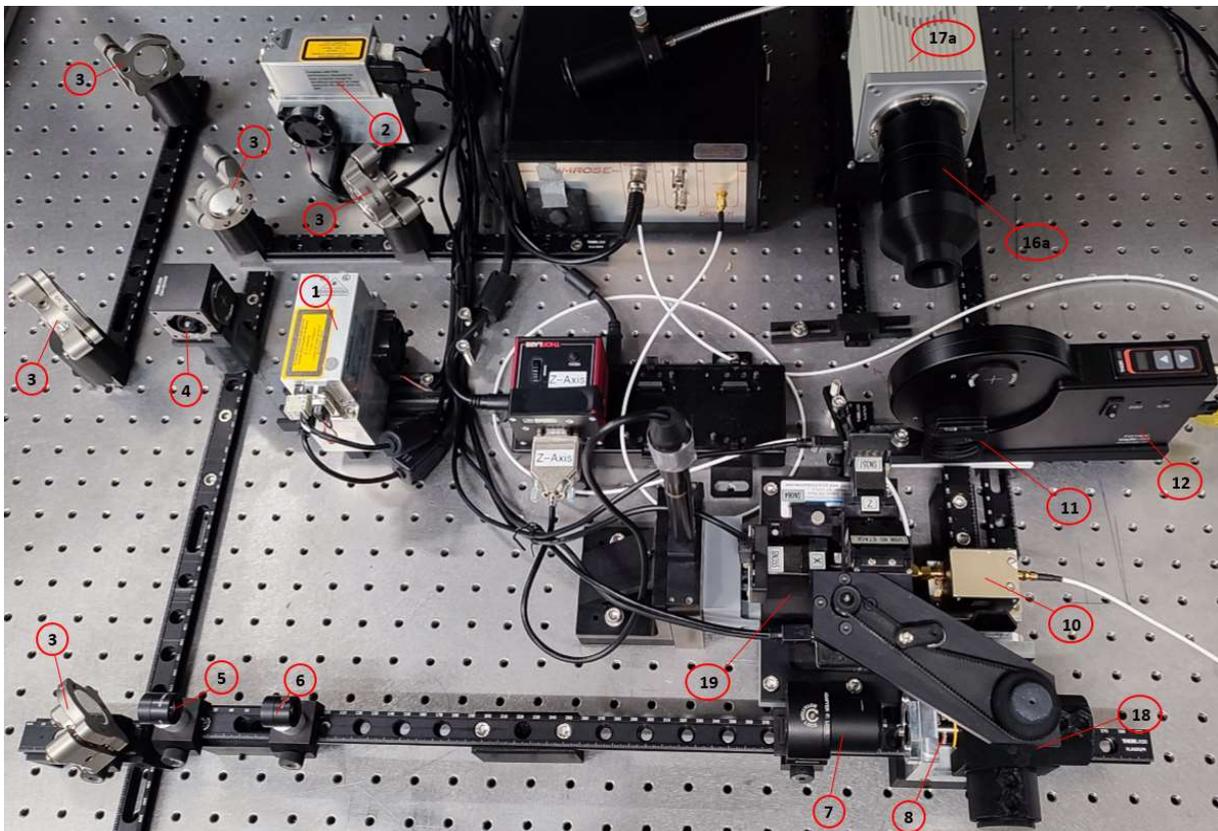


Abbildung 25: Umgesetzter Gesamtaufbau des LSRM basierend auf den theoretischen Grundlagen aus Kapitel 2.1. Eine detaillierte Auflistung der Komponenten ist in Tabelle 4 dargestellt. Das nicht beschriftete Detektionsobjektiv (Bauteil 9) ist aufgrund des Auslegers der Verfahrereinheit nicht sichtbar.

Der Abstand zwischen den einzelnen Komponenten im implementierten Illuminationspfad, wie in Abbildung 26 dargestellt, wurde bewusst großzügig gewählt. Diese großzügige Anordnung ermöglicht eine bequeme Zugänglichkeit zu den verschiedenen justierbaren Komponenten. Darüber hinaus erleichtert ein großer Lichtweg die koaxiale Ausrichtung der Laserstrahlen, da selbst geringfügige Änderungen einen deutlichen und nachvollziehbaren Einfluss auf den Verlauf der Strahlen haben können.

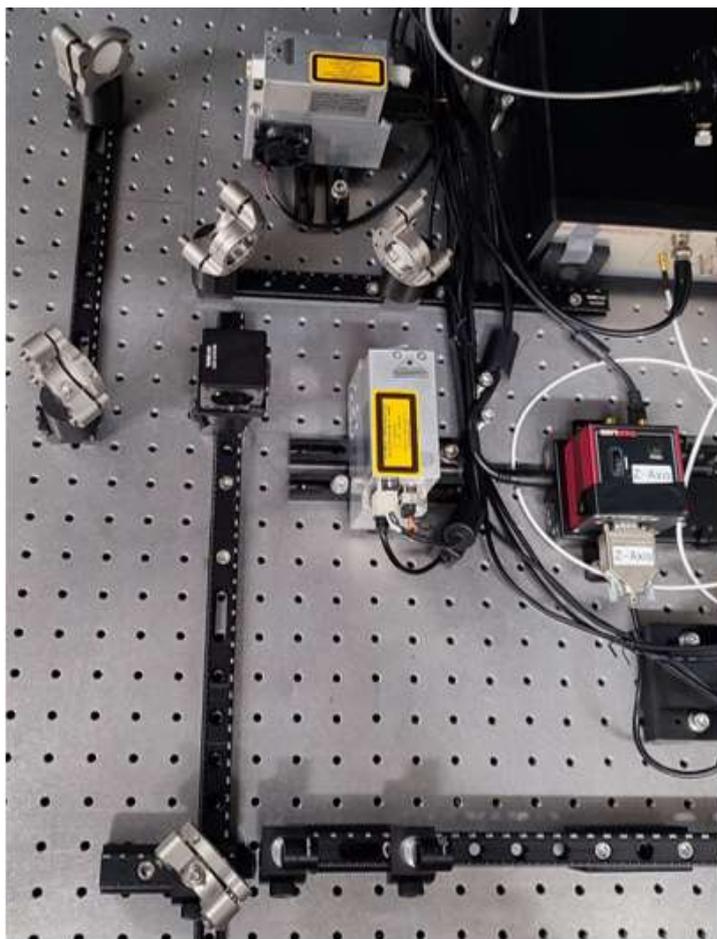


Abbildung 26: Illuminationspfad im LSMR ohne Illuminationsobjektiv. Mit diesem Aufbau wird die koaxiale Ausrichtung der Laserstrahlen durch vier planare Reflexionsspiegel und einen dichroitischen Spiegel ermöglicht.

Die Detektionsseite des Aufbaus besteht aus mehreren Komponenten, darunter die Probenkammer, der AOTF, das Filterrad und die Detektionseinheit, welche je nach Bedarf entweder eine Kamera oder ein Spektrometer sein kann. In Abbildung 27 wird das LSMR mit beiden möglichen Detektionsvarianten veranschaulicht. Für die Kamera-Detektion wird die Kamera, die auf einem Schlitten platziert ist und ein entsprechendes Kameraobjektiv aufweist, an das Filterrad herangeführt und durch eine passgenaue Halterung sicher befestigt. Hierbei ermöglicht der Schlitten eine präzise Positionierung der Kamera in Relation zum Filterrad. Bei der spektroskopischen Detektionsvariante wird der Kameraschlitten in eine hintere Position gefahren, um Platz für den Spektrometeradapter zu schaffen. Der Adapter wird mittels einer Schraubverbindung mit dem Filterrad verbunden, sodass das Spektrometer eine stabile und präzise Verbindung zur Detektionseinheit herstellt. Durch diese flexible Anordnung ist es möglich, je nach Bedarf zwischen der Kamera- und der spektroskopischen Detektion zu wechseln, indem die entsprechenden Komponenten entsprechend positioniert und befestigt werden.

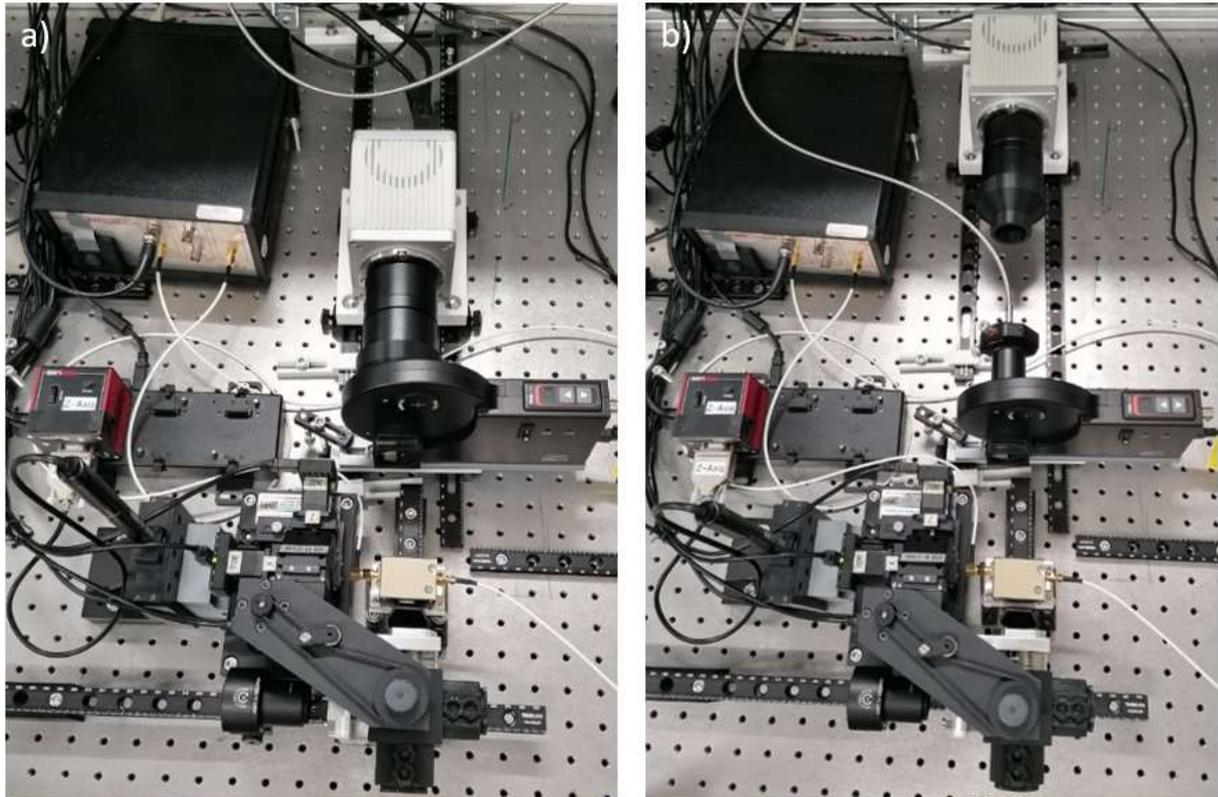


Abbildung 27: Detektionspfad des LSRM mit den beiden Detektionsvarianten (a) Kamera und (b) Spektrometer.

Eine vergrößerte Darstellung des Spektrometeradapter mit angeschlossener Glasfaser ist in Abbildung 28 zu sehen. Das Raman-Spektrometer befindet sich am anderen Ende der Glasfaser und ist nicht dargestellt.



Abbildung 28: Spektrometeradapter der Glasfaser an dem Filtrerrad zur Einkopplung der Messsignale in das Spektrometer.

3.1.3 Laserstabilität

Die Laserstabilität spielt eine essenzielle Rolle bei der Bewertung der späteren Messergebnisse. Um diese Stabilität zu beurteilen, wurden Messreihen für beide Laser mit unterschiedlichen Lichtleistungen durchgeführt. Dabei wurden über einen Zeitraum von 15

Minuten alle 30 Sekunden Messwerte aufgenommen. Anschließend wurde der Laser für 15 Minuten ausgeschaltet. Jede Messreihe wurde für jeden Leistungswert dreimal wiederholt, um eine robuste Datengrundlage zu gewährleisten. Die spezifischen Leistungsmessparameter sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Messreihen sind in den nachfolgenden Abbildungen visualisiert. Diese Darstellungen ermöglichen eine direkte Einsicht in die Laserstabilität in Abhängigkeit von der Leistungseinstellung. Durch die Wiederholung der Messungen wird eine statistische Aussagekraft erreicht und mögliche Schwankungen können erfasst werden. Die Abbildungen bieten somit einen umfassenden Überblick über die Leistungsstabilität der Laser während des Messzeitraums.

Tabelle 9: Leistungseinstellung der Laser zur Bestimmung der Laserstabilität.

Nr.	Laser 1 (785 nm)	Laser 2 (660 nm)
1	1 mW	1 mW
2	5 mW	5 mW
3	10 mW	10 mW
4	50 mW	50 mW
5	100 mW	100 mW
6	150 mW	130 mW (max. Leistung)
7	200 mW (max. Leistung)	

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der Messreihen 1 bis 3 für Laser 1 (785 nm). Die einzelnen Messreihen werden zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Daten kombiniert in einem Diagramm dargestellt.

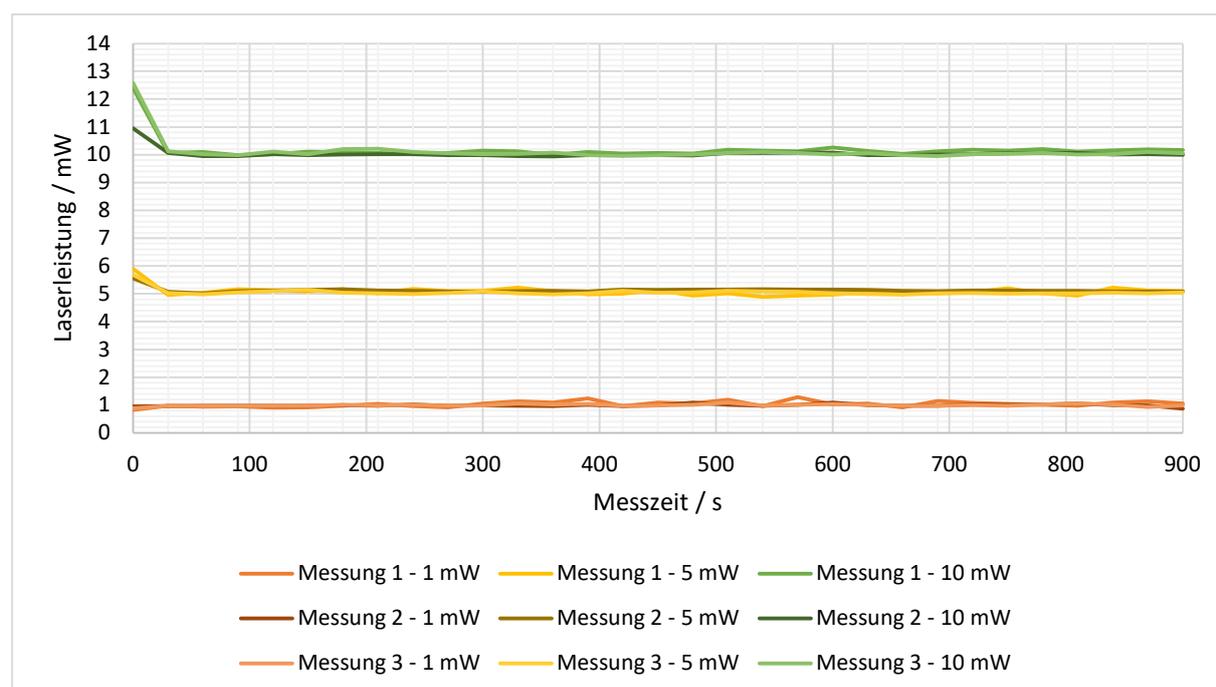


Abbildung 29: Gemessene Laserleistungen der Messreihen 1 bis 3 für Laser 1 (785 nm).

Die Messergebnisse zeigen, dass nach einer Einschwingzeit von $t_0 = 30\text{ s}$ die vorgegebene Laserleistung erreicht ist und Laser 1 mit geringen relativen Abweichungen das vorgegebene Leistungsniveau beibehält.

Die relative Abweichung der Mittelwerte der Messreihen 1 bis 3 mit Laser 1 werden in Abbildung 30 gezeigt. Hierfür werden die drei Messungen der entsprechenden Messreihe akkumuliert und ein Mittelwert gebildet, der in einem Balkendiagramm dargestellt wird.

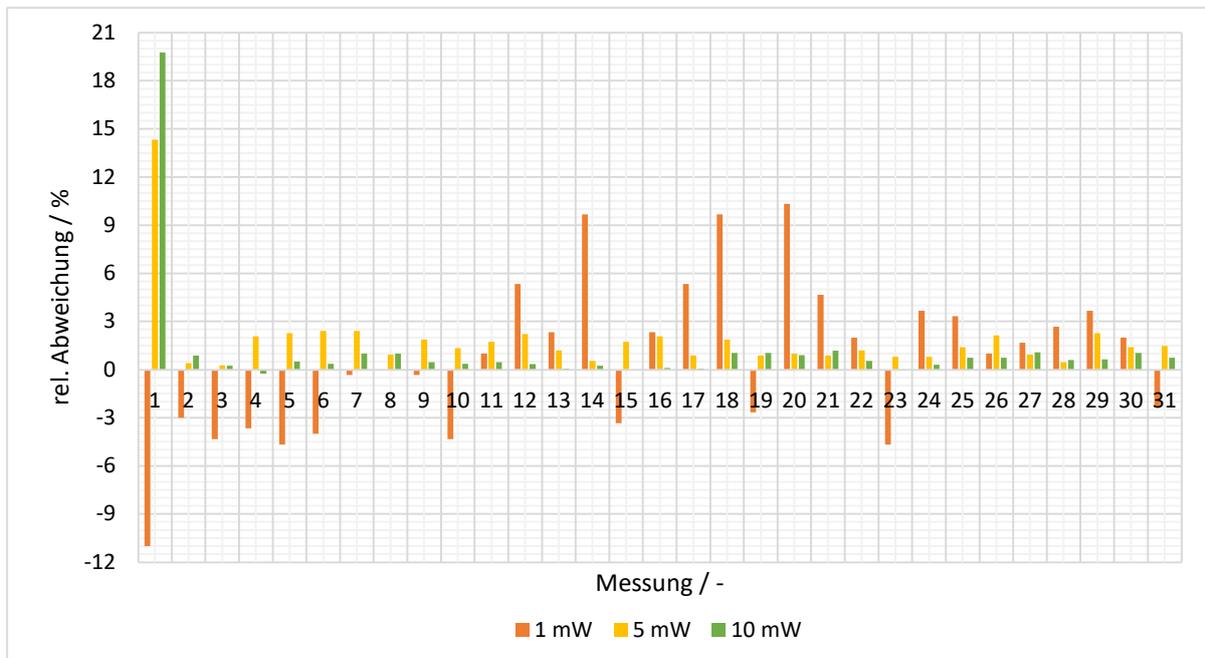


Abbildung 30: Relative Abweichung der gemittelten Messwerte über die drei Messungen der Messreihen 1 bis 3 bei Laser 1 (785 nm).

Beachtet man nur die relativen Schwankungen nach der ermittelnden Einschwingzeit t_0 , so zeigt die Messreihe für 1 mW eine relative Schwankung zwischen +10,3 % (Messpunkt 20) und -4,7 % (Messpunkt 5). Die im Vergleich zu den anderen Leistungsvorgaben großen Schwankungen bei Messreihe 1 (1mW) ergeben sich durch die niedrige absolute Leistung von 1 mW. Kleinste Schwankungen haben bei niedrigen Leistungen relativ gesehen eine große Auswirkung. Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die relativen Schwankungen der Messreihen mit 5 und 10 mW, so sind die gemittelten relativen Abweichungen mit +0,3 % (Messpunkt 2) bis +2,4 % (Messpunkt 6) bei 5 mW und -0,2 % (Messpunkt 4) bis +1,2 % (Messpunkt 21) bei 10 mW gleichwertig einzustufen. Betrachtet man die absoluten Messwerte der einzelnen Messungen, so schwanken die Messsignale der einzelnen Messungen zwischen -0,1 mW und +0,1 mW bezogen auf die eingestellte Leistung. Die Messergebnisse für höhere Leistungen (Messreihe 4 bis 7) für Laser 1 (785 nm) sind in Abbildung 31 zu sehen.

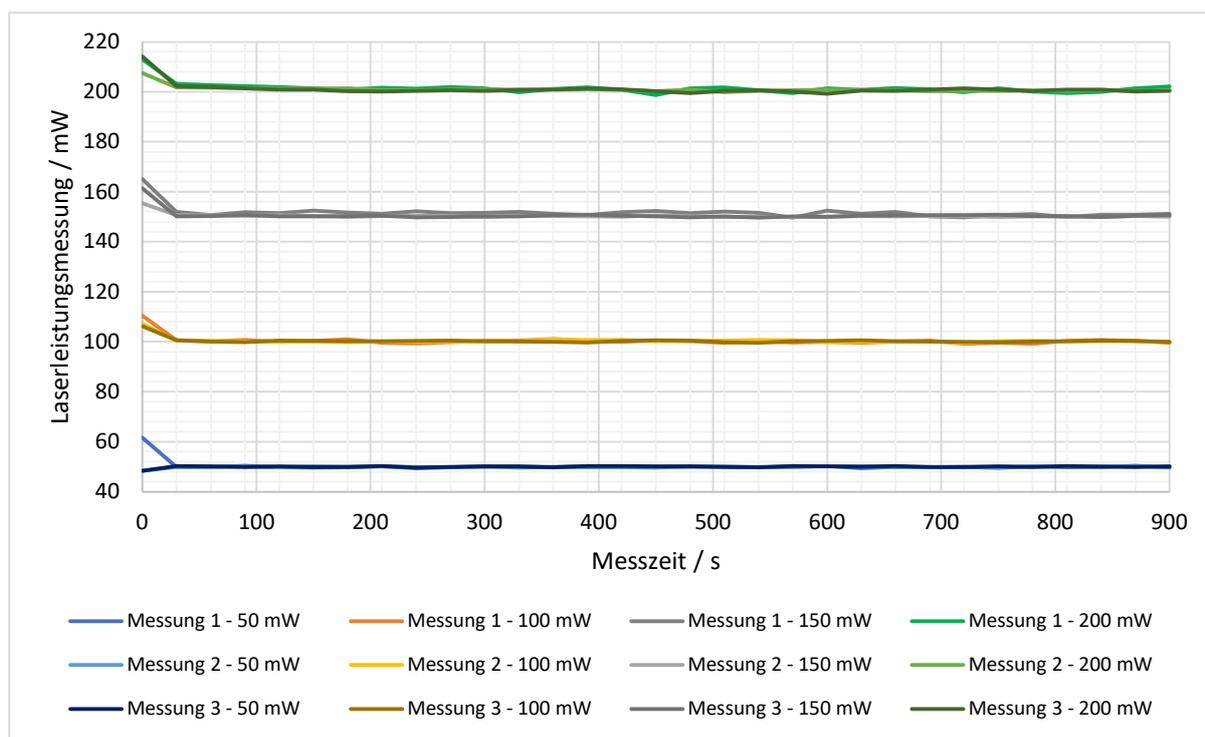


Abbildung 31: Gemessene Laserleistungen der Messreihen 4 bis 7 für Laser 1 (785 nm).

Wie bei den niedrigen Leistungen der Messreihen 1 bis 3 zu sehen, schwankt der Laser bei den Messreihen 4 bis 7 nach dem Einschalten in unterschiedlichen Leistungsregionen. Nach einer Einschwingzeit von $t_0 = 30 \text{ s}$ stabilisiert sich das Messsignal bei der voreingestellten Laserleistung. Die gemittelten relativen Schwankungen im Verlauf der einzelnen Messreihen sind in Abbildung 32 dargestellt.

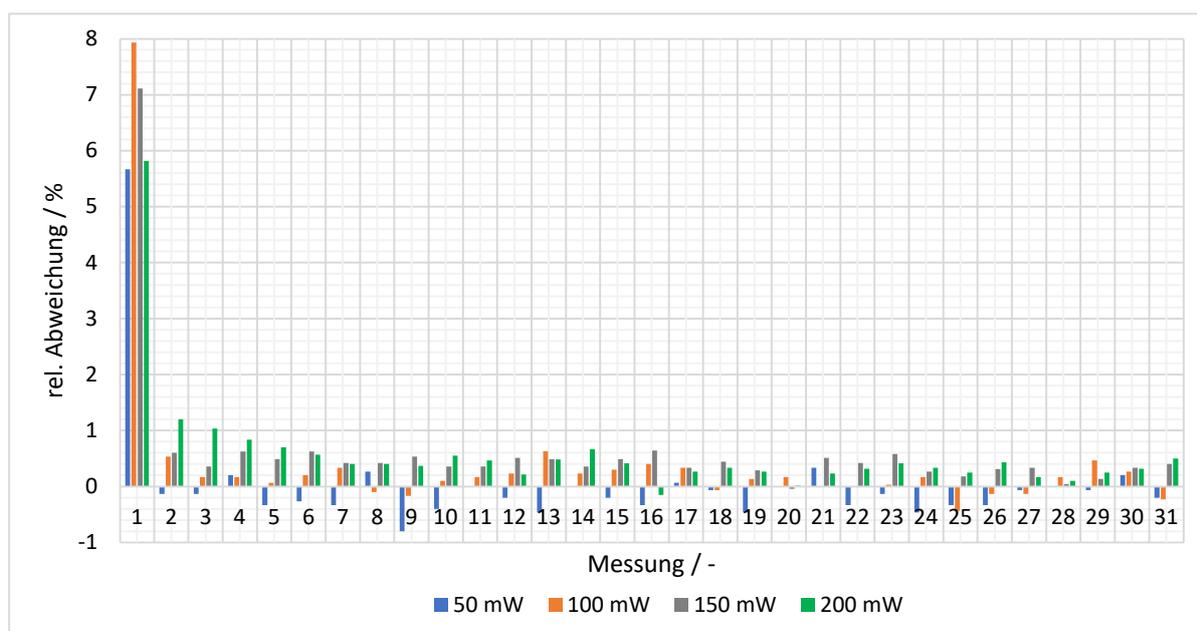


Abbildung 32: Relative Abweichung der gemittelten Messwerte über die drei Messungen der Messreihen 4 bis 7 bei Laser 1 (785 nm).

Die gemittelten relativen Abweichungen der Messreihen 4 bis 7 bei Laser 1 (785 nm) zeigen ein homogenes Bild. Lässt man auch hier die Messungen der Einschwingzeit außer Acht, so bewegen sich die relativen Abweichungen zwischen +1,2 % bei 200 mW (Messung 2) und – 0,8 % bei 50 mW (Messung 9). Die absoluten Abweichungen der unterschiedlichen Messwerte schwanken über alle Messreihen betrachtet zwischen +2,2 mW und -0,4 mW bezogen auf die eingestellten Leistungen.

Neben den relativen Abweichungen der gemittelten Messreihen wird zur Beurteilung der einzelnen Laser auch die Standardabweichung benötigt. Diese wird aus den Messungen nach der Einschwingzeit des Lasers ermittelt und ist in Abbildung 33 für die Messreihen von Laser 1 dargestellt.

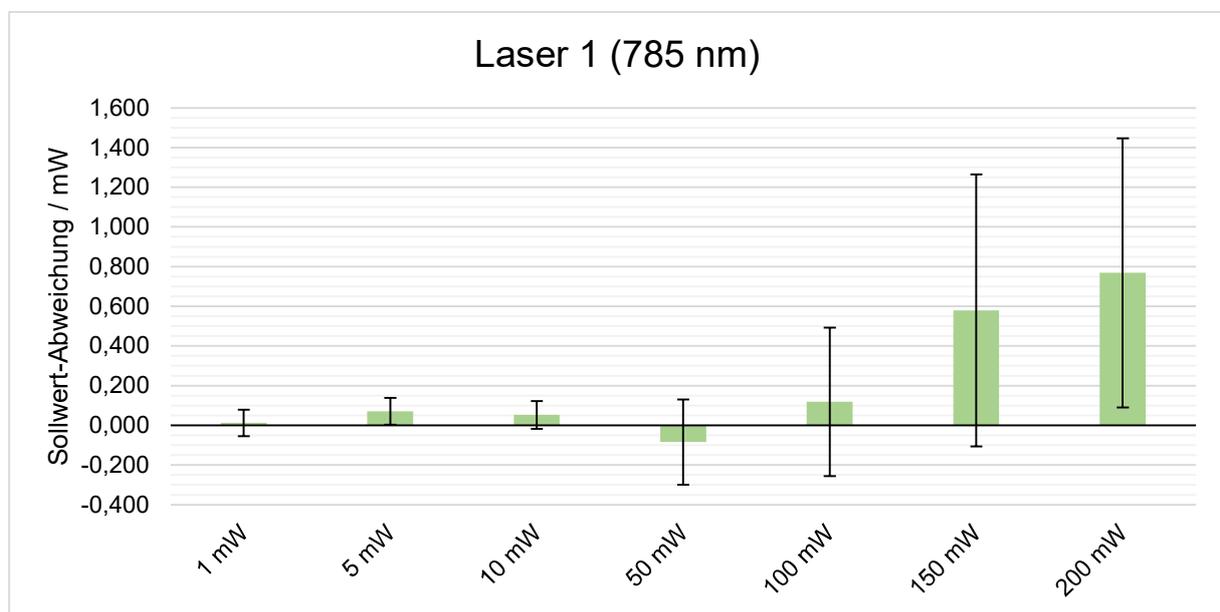


Abbildung 33: Standard- und Sollwert-Abweichungen der Messreihen von Laser 1 (785 nm).

Es ist ersichtlich, dass die Standardabweichungen der einzelnen Messreihen einen positiven Zusammenhang mit den Laserleistungen aufweisen, da sie mit zunehmender Leistung ansteigen. Dennoch weist die schmale Bandbreite der Standardabweichung auf eine geringe Variabilität der Messwerte hin und bestätigt somit die Stabilität des Lasers, auch bei höheren Leistungsstufen. Die höchste relative Standardabweichung wird bei den Messungen mit einer Laserleistung von 1 mW beobachtet und beträgt $\pm 0,06$ mW oder $\pm 6,63$ % in Bezug auf die Sollleistung. Wenn wir die Standardabweichung bei einer Laserleistung von 200 mW betrachten, ergibt sich zwar ein absoluter Wert von $\pm 0,68$ mW, jedoch stellt die Abweichung in Relation zum Messwert von 200 mW lediglich $\pm 0,34$ % dar.

Darüber hinaus zeigt sich, dass die Abweichungen der Mittelwerte von der Sollleistung bei höheren Leistungsbereichen absolut gesehen zunehmen, mit einem Maximum von +0,77 mW bei einer Sollleistung von 200 mW. Dennoch verdeutlichen die relativen Abweichungen

zwischen 1,2% (bei 1 mW) und 0,38% (bei 200 mW), dass der Laser präzise einstellbar ist und nur geringfügige Abweichungen von der gewünschten Leistung aufweist.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Laser 1 mit einer Wellenlänge von 785 nm bei höheren Leistungen eine erhöhte Stabilität aufweist im Vergleich zu niedrigeren Leistungseinstellungen, wodurch die Realisierung konsistenter und reproduzierbarer Ergebnisse bei höheren Leistungen begünstigt wird.

Analog zu Laser 1 (785 nm) erfolgt die Darstellung der Stabilitätsmessungen für Laser 2 (660 nm). Die Messergebnisse der Messreihen 1 bis 3 von Laser 2 sind in Abbildung 34 dargestellt.

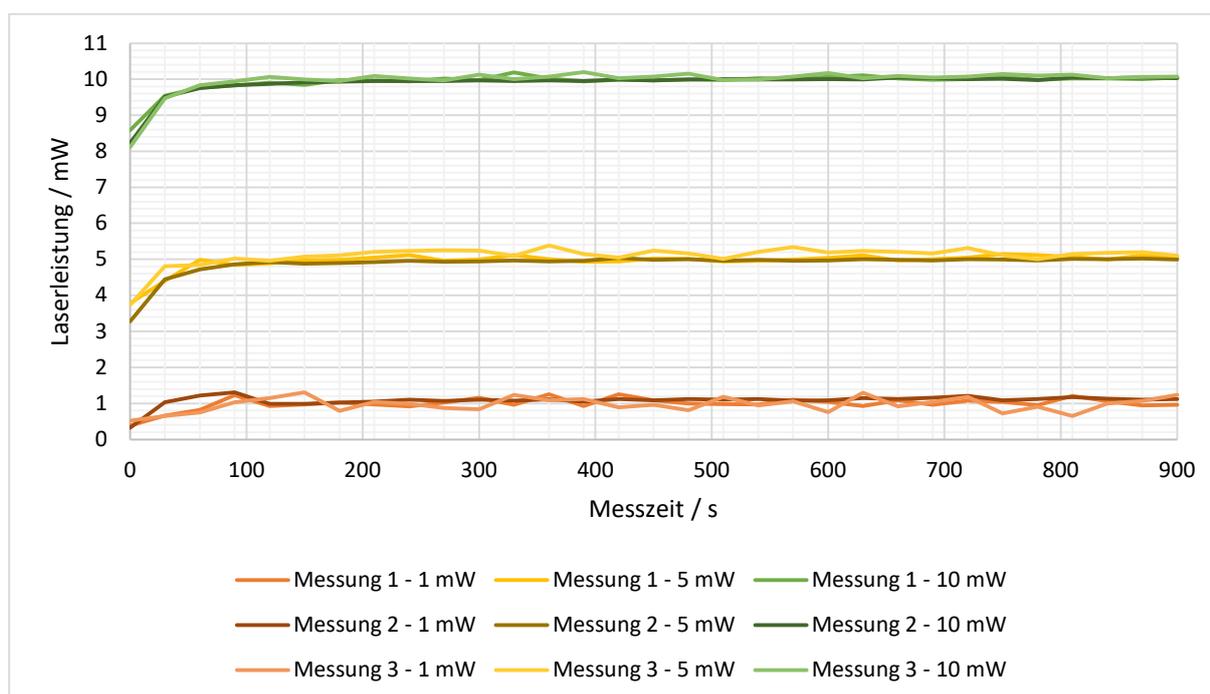


Abbildung 34: Gemessene Laserleistungen der Messreihen 1 bis 3 für Laser 2 (660 nm).

Bei der Analyse der Messergebnisse der Messreihen 1 bis 3 fällt eine Einschwingzeit von $t_0 = 60$ s auf, bevor das eingestellte Leistungsniveau erreicht wird. Ein sorgfältiger Blick auf die Graphen offenbart, dass die Messungen im Vergleich zu den Messungen von Laser 1 bei gleicher Leistungsstufe (siehe Abbildung 29) einen deutlich instabileren Verlauf aufweisen. Dies wird durch die detaillierte Betrachtung der mittleren relativen Abweichung der einzelnen Messreihen in Abbildung 35 eindeutig unterstrichen.



Abbildung 35: Relative Abweichung der gemittelten Messwerte über die drei Messungen der Messreihen 1 bis 3 bei Laser 2 (660 nm).

Die mittlere relative Abweichung der ersten Messreihe (1 mW) von Laser 2 (660 nm) zeigt im Vergleich zu anderen Messreihen nach der Einschwingzeit $t_0 = 60 \text{ s}$ große Schwankungen. Diese Schwankungen bewegen sich zwischen +19,0 % (Messpunkt 4) und -7,1 % (Messpunkt 3). Bei einer Leistung von 5 mW variieren die relativen Abweichungen zwischen +2,4 % (Messpunkt 25) und -3,1 % (Messpunkt 3), während sie bei 10 mW zwischen +0,8 % (Messpunkt 21) und -2,2 % (Messpunkt 3) liegen. Die absoluten Abweichungen innerhalb dieser drei Messreihen bewegen sich im Bereich von +0,2 mW bis -0,1 mW. Trotz des instabileren Verlaufs von Laser 2 zeigen die absoluten Messergebnisse für niedrige Leistungen bis zu 10 mW eine vergleichbare Stabilität wie die von Laser 1. Dies lässt darauf schließen, dass Laser 2 trotz seiner Schwankungen für Messungen mit niedriger Leistung geeignet ist.

Für eine weitergehende Analyse werden in den Messreihen 4 bis 6 höhere Leistungen für Laser 2 (660 nm) untersucht. Die Ergebnisse dieser Messreihen sind in Abbildung 36 dargestellt.

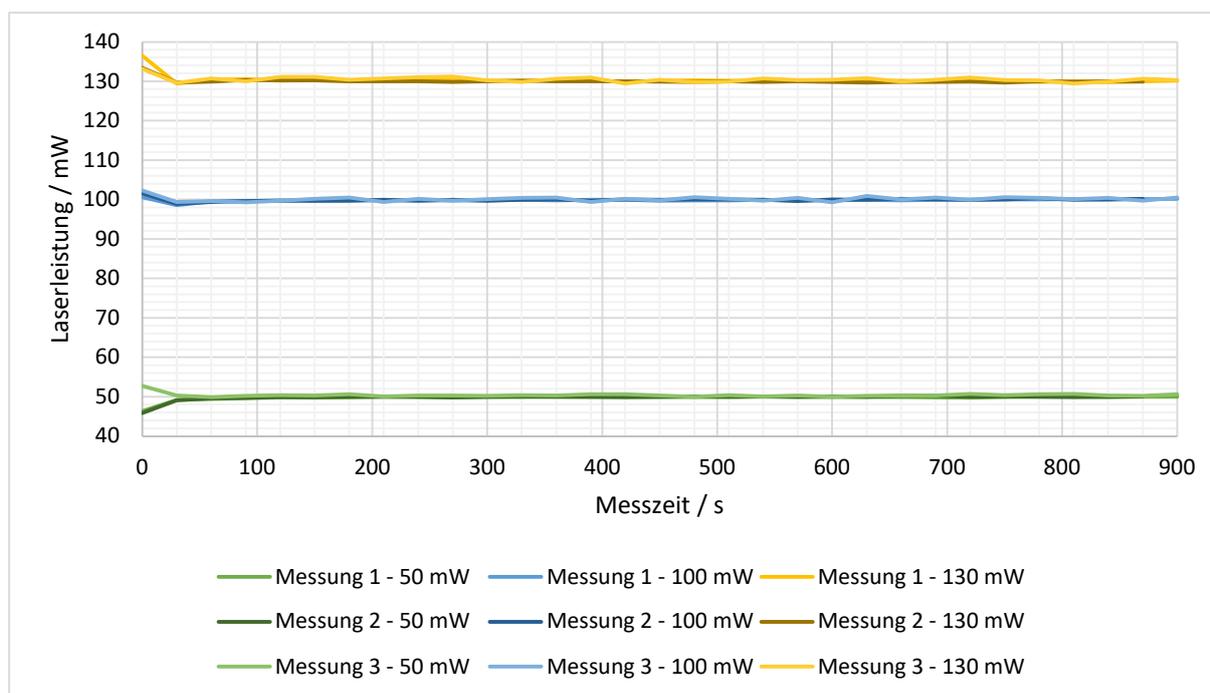


Abbildung 36: Gemessene Laserleistungen der Messreihen 4 bis 7 für Laser 2 (660 nm).

Bei Leistungen zwischen 50 und 130 mW für Laser 2 (660 nm) zeigt sich ein bereits bekanntes Einschwingverhalten. Die Einschwingzeit wird bei diesen Leistungen im Gegensatz zu niedrigeren Leistungen auf $t_0 = 30$ s bestimmt. Zudem weisen die Kurven einen stabileren Verlauf auf. Dies wird auch durch die mittleren relativen Abweichungen der einzelnen Messreihen in Abbildung 37 bestätigt.

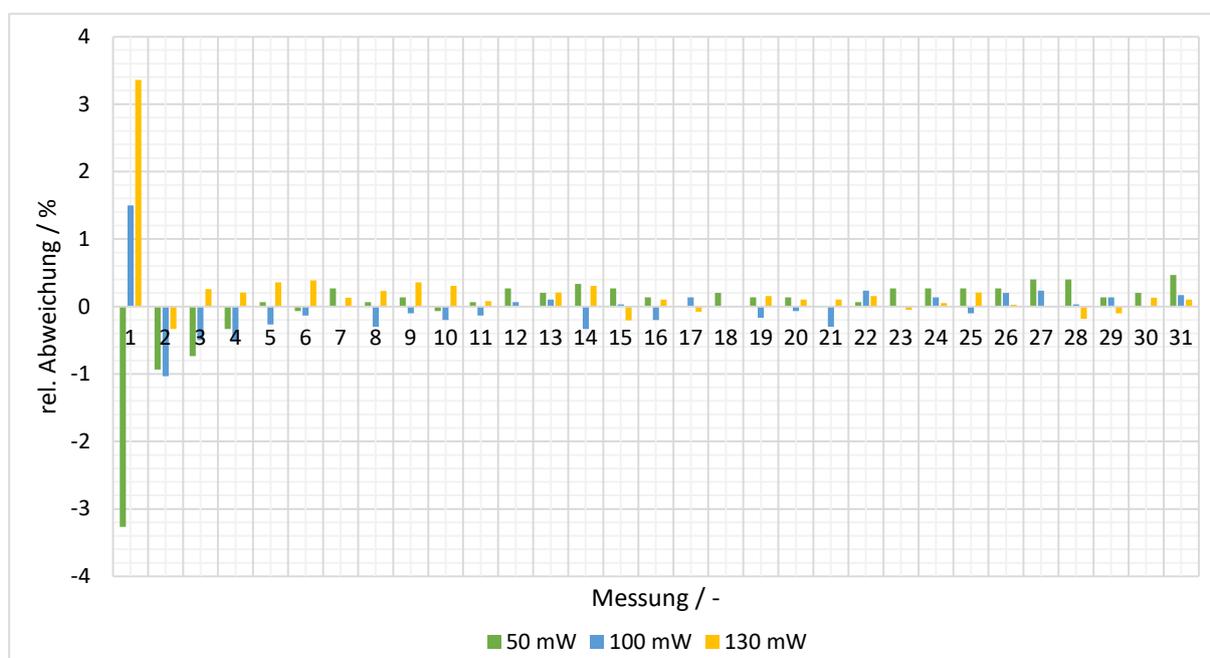


Abbildung 37: Relative Abweichung der gemittelten Messwerte über die drei Messungen der Messreihen 4 bis 6 bei Laser 2 (660 nm).

Bei den Messreihen 4 bis 6 von Laser 2 (660 nm) zeigen die gemittelten relativen Abweichungen nach der Einschwingzeit t_0 ein ähnlich homogenes Bild wie die Ergebnisse für Laser 1 bei höheren Leistungen. Die maximalen Abweichungen betragen hier -1,0 % bei 100 mW (Messpunkt 2) und +0,5 % bei 50 mW (Messpunkt 31). In Absolutwerten ausgedrückt, schwankt die Leistung in diesen Bereichen zwischen -1 mW und +0,25 mW.

Die Standardabweichungen der Messungen mit Laser 2 sind in Abbildung 38 dargestellt.

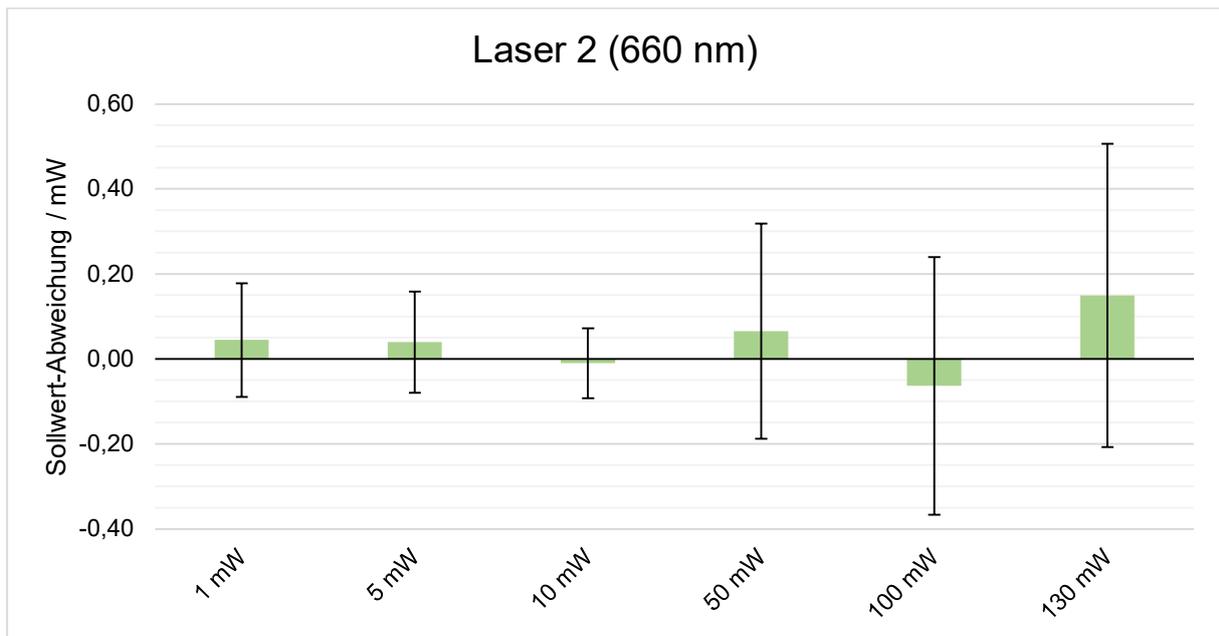


Abbildung 38: Standard- und Sollwert-Abweichungen der Messreihen von Laser 2 (660 nm).

Die Auswertungsergebnisse zeigen, dass die Standardabweichung der Messungen mit zunehmender Laserleistung in absoluten Zahlen ansteigt. Beispielsweise beträgt die Standardabweichung bei einer minimalen Leistung von 1 mW $\pm 0,13$ mW, während sie bei einer maximalen Leistung von 130 mW $\pm 0,35$ mW beträgt. Wenn wir die Standardabweichung im Verhältnis zum Mittelwert betrachten, ergeben sich Abweichungen von $\pm 13,4\%$ bei 1 mW und $\pm 0,55\%$ bei 130 mW. Interessanterweise zeigen sich bei der Betrachtung der Abweichungen der Mittelwerte im Verhältnis zur Sollleistung klare Trends. Die absoluten Abweichungen nehmen mit zunehmender Leistung zu, wobei die höchste Abweichung von +0,15 mW bei einem Sollwert von 130 mW festgestellt wird. Dies verdeutlicht, dass die Genauigkeit der Messungen in Bezug auf die Laserleistung von der absoluten Abweichung beeinflusst wird. Für Laser 2 mit einer Anregungswellenlänge von 660 nm lässt sich feststellen, dass die eingestellten Laserleistungen mit minimalen Abweichungen erreicht werden. Die relativen Abweichungen der einzelnen Messreihen bei niedrigen Leistungen zeigen, dass der Laser eine höhere Variation aufweist, was zu stärkeren Signalschwankungen führen kann. Bei höheren Leistungen hingegen sind die Messwertvariationen geringer und der Laser zeigt eine größere Stabilität. Dies wird auch durch die Standardabweichungen in den einzelnen

Messreihen unterstützt, die darauf hinweisen, dass der Laser bei höheren Leistungen stabiler läuft und die Ergebnisse reproduzierbarer sind.

Ein Vergleich beider Laser zeigt, dass sie bei höheren Leistungen stabil laufen und reproduzierbare Ergebnisse liefern können. Allerdings hat Laser 1 eine höhere Leistungsfähigkeit von bis zu 200 mW, während Laser 2 auf 130 mW begrenzt ist. Bis zu einer Leistung von 100 mW sind die Ergebnisse beider Laser vergleichbar in Bezug auf die Abweichung vom Sollwert, mit 1,2 mW für Laser 1 und 0,6 mW für Laser 2. Bei höheren Leistungen steigt die Abweichung von Laser 1 auf bis zu 0,77 mW an. Die Standardabweichung bis zu einer Leistung von 100 mW ist bei beiden Lasern vergleichbar, mit Werten von $\pm 0,37$ mW für Laser 1 und $\pm 0,31$ mW für Laser 2. Allerdings steigt die Standardabweichung bei Laser 1 bei höheren Leistungen stark an, auf $\pm 0,68$ mW bei 150 mW bzw. $\pm 0,67$ mW bei 200 mW, während die Standardabweichung bei Laser 2 bei einer Leistung von 130 mW bei $\pm 0,36$ mW bleibt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl Laser 1 als auch Laser 2 bei höheren Leistungen stabil laufen und reproduzierbare Ergebnisse liefern können. Laser 1 weist eine größere Leistungsfähigkeit bis zu 200 mW auf, während Laser 2 auf 130 mW beschränkt ist. Bei Leistungen bis zu 100 mW sind die Ergebnisse beider Laser vergleichbar, sowohl in Bezug auf die Abweichung vom Sollwert als auch die Standardabweichung. Allerdings zeigt Laser 1 bei höheren Leistungen eine größere Abweichung vom Sollwert und eine höhere Standardabweichung im Vergleich zu Laser 2. Daher ist Laser 2 insbesondere bei Anwendungen mit niedrigeren Leistungsniveaus eine gute Wahl, während Laser 1 für Anwendungen mit höheren Leistungsanforderungen geeigneter sein könnte. Die Auswahl des geeigneten Lasers hängt somit von den spezifischen Anforderungen und dem gewünschten Leistungsbereich der Anwendung ab.

3.1.4 Koaxiale Ausrichtung der Laserstrahlen

Die koaxiale Ausrichtung der Strahlengänge beider Laser wird mit einem optischen Strahlprofilmessgerät, genannt Beam Profiler (Scanning Slit Optical Beam Profiler BP209-VIS/M, Thorlabs GmbH, Deutschland) realisiert. Mit dem Beam Profiler wird mit der knife-edge Methode die Profilierung der Lichtstrahlen in Form von Strahldurchmesser, Elliptizität und radialen Abstand entlang der x- und y-Achse bestimmt.^{169,170} Diese etablierte Methode platziert eine rotierende Klinge im Laserstrahl und detektiert die nach dem Einsatz der Klinge noch übertragende Leistung. Die Bruchteile des Strahls werden von 0 % bis 100 % aufgezeichnet. Der Überlappungsgrad zwischen Spalt und Strahl entspricht der transmittierten optischen Intensität und nimmt mit zunehmender Überlappung ab. Daraus wird ein Intensitätsprofil entlang der X- und Y-Achse generiert. Mit diesen Daten werden die Parameter der Spitzenleistung, der Lage des Strahlschwerpunktes in Bezug auf jede Achse, der Strahldurchmesser sowie die Elliptizität bestimmt. Der Beam Profiler wird entsprechend

Abbildung 40 an zwei Positionen im Lichtweg der Laser platziert. Durch fünf kinematisch gelagerte und individuell regulierbare Spiegel, je zwei pro Laser sowie ein weiterer für die Ausrichtung des kombinierten Strahls auf die Probenkammer, wird der Strahlengang justiert und so angepasst, dass die Laserstrahlen koaxial ausgerichtet sind. Durch diesen essenziellen Schritt wird in der späteren Anwendung gewährleistet, dass die auf die Probe projizierten Lichtblätter kongruent sind.

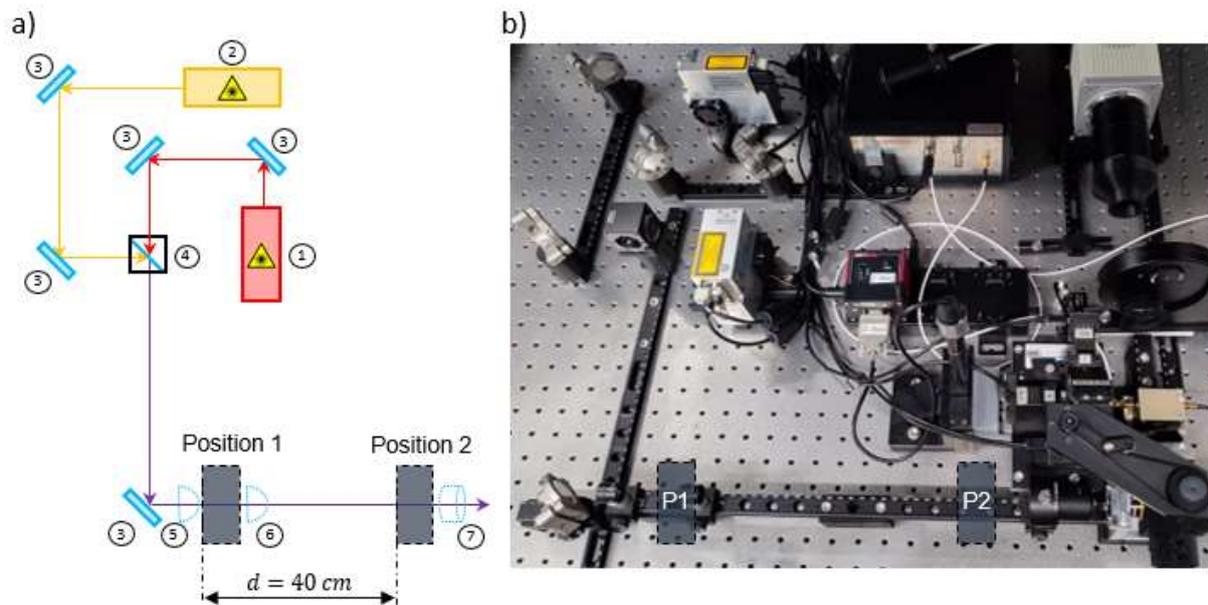


Abbildung 39: Fixe Positionierung des Strahlprofilmessgeräts im Illuminationspfad zur Justage der Strahlengänge a) in der schematischen Darstellung und b) im realen Aufbau. Die in der Zeichnung nummerierten Komponenten sind in Tabelle 4 aufgelistet. Für die koaxiale Ausrichtung der Laser werden die gepunkteten Bauteile 5, 6 und 7 entfernt.

Der Abstand von 40 cm zwischen den beiden Messpositionen wurde sorgfältig am realen Aufbau gemessen und stellt den maximal möglichen Abstand dar, ohne dass es zu Kollisionen mit anderen Komponenten kommt. Um den Beam Profiler zu befestigen, wird eine speziell im 3D-Druckverfahren hergestellte Halterung verwendet. Durch die Platzierung auf der montierten Schwalbenschwanzschiene wird sichergestellt, dass der Beam Profiler auf derselben optischen Achse positioniert wird. Nach jeder Veränderung der Spiegelausrichtung wird die Position des Beam Profilers gewechselt. Darüber hinaus werden die Laser abwechselnd aktiviert, um die Messdaten zu erfassen. Das Ergebnis dieses iterativen Prozesses an Position 1 (P1) ist in Abbildung 40 zu sehen. Bei der Betrachtung ist zu beachten, dass beide Laser gleichzeitig aktiv sind und ein überlagertes Bild dargestellt wird. Die Ergebnisse sollten daher so interpretiert werden, dass die Positionsangaben die geometrischen Eigenschaften innerhalb des Beam Profilers darstellen. Um sicherzustellen, dass die Laser koaxial ausgerichtet sind, sollten die Messergebnisse daher nahezu identisch sein.

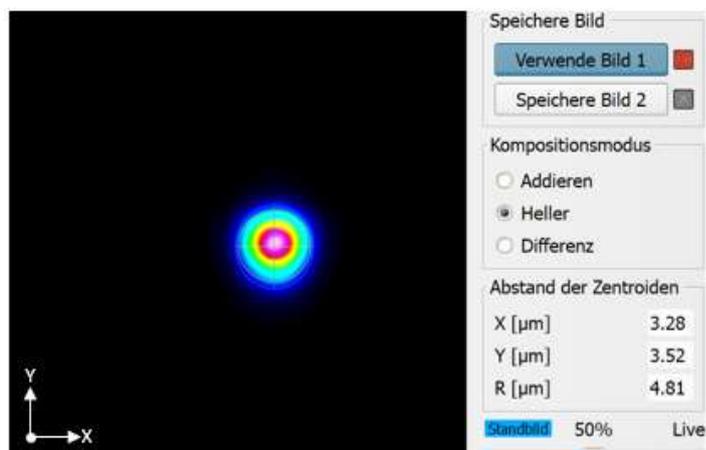


Abbildung 40: Geometrische Parameter der coaxial ausgerichteten Laser an Position 1. Beide Laser sind bei dieser Darstellung aktiv.

Die Ergebnisse der Messung an Position 1 geben an, dass der kombinierte Laserstrahl eine X-Koordinate von $3,28 \mu\text{m}$ und eine Y-Koordinate von $3,52 \mu\text{m}$ besitzt. Der radiale Abstand R beschreibt den Abstand von einem nicht spezifizierten Punkt M (hier: Zentrum der Laser) zum Ursprung des Koordinatensystems.¹⁶⁹ In diesem Fall beträgt R $4,81 \mu\text{m}$.

Die Ergebnisse der Messungen an Position 2 (P2) sind in Abbildung 41 dargestellt.

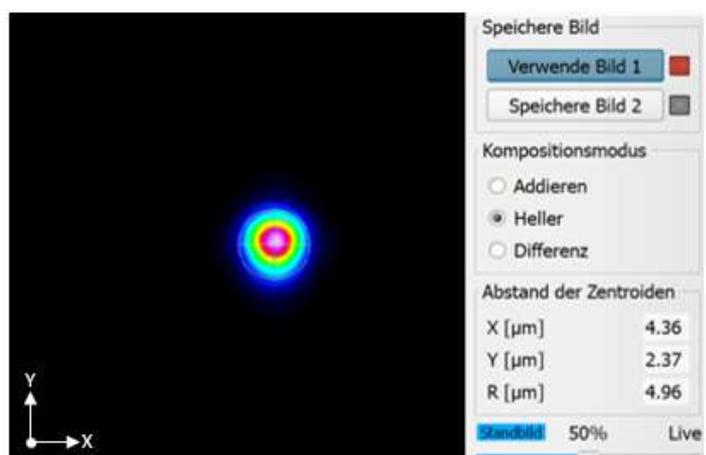


Abbildung 41: Geometrische Parameter der coaxial ausgerichteten Laser an Position 2. Beide Laser sind bei dieser Darstellung aktiv.

Die geometrischen Positionen der kombinierten Laserstrahlen an Position 2 ergeben eine X-Koordinate von $4,36 \mu\text{m}$ und eine Y-Koordinate von $2,37 \mu\text{m}$. Der radiale Abstand R beträgt $4,96 \mu\text{m}$. In Bezug auf die gesamte Messstrecke von 40 cm lässt sich eine absolute Abweichung in der X-Richtung von $1,08 \mu\text{m}$ und in der Y-Richtung von $1,15 \mu\text{m}$ feststellen. Der radiale Abstand R verringert sich um $0,15 \mu\text{m}$. Die relativen Abweichungen der einzelnen Positionen, bezogen auf die Gesamtstrecke von 40 cm , betragen $0,00027 \%$ für die X-Koordinate und $0,00029 \%$ für die Y-Koordinate. Die Abweichung des radialen Abstands R beträgt $0,00004 \%$. Anhand dieser ermittelten Daten lässt sich ableiten, dass die Lichtwege

beider Laser nahezu ideal koaxial ausgerichtet sind und die ermittelten Abweichungen vernachlässigbar sind.

3.1.5 Lichtblattdimensionen

Die Lichtblattdimensionen sind für die Bestimmung der minimalen Auflösung des Mikroskops essenziell. Um den Nachweis der Lichtblattdicken beider Emissionswellenlängen zu generieren, wird ein optisches Strahlprofilmessgerät (Beam Profiler) an der Position der Probenkammer platziert. Da die geometrischen Dimensionen des Beam Profilers nicht zulassen, dass das Messgerät innerhalb der montierten Probenkammer positioniert wird, erfolgt eine Teildemontage dieser, auch das Detektionsobjektiv wird entfernt. Anschließend wird der Beam Profiler mit einer speziellen Halterung an der Verfahrereinheit des Mikroskops befestigt. Durch diese Maßnahme kann der Beam Profiler durch das projizierte Lichtblatt bewegt werden. Die Messmodalitäten für die Bestimmung der Dimensionen der Lichtblätter besagen, dass über eine Strecke von 10 mm mit einer Schrittweite von 10 μm verfahren und an jeder Messstelle Messdaten akquiriert werden. Sobald die Dicke des vermessenen Lichtblatts einen Schwellenwert von 20 μm unterschreitet, wird die Schrittweite auf 5 μm reduziert. Die Positionierung innerhalb des Aufbaus ist in schematischer und realer Darstellung in Abbildung 42 gezeigt.

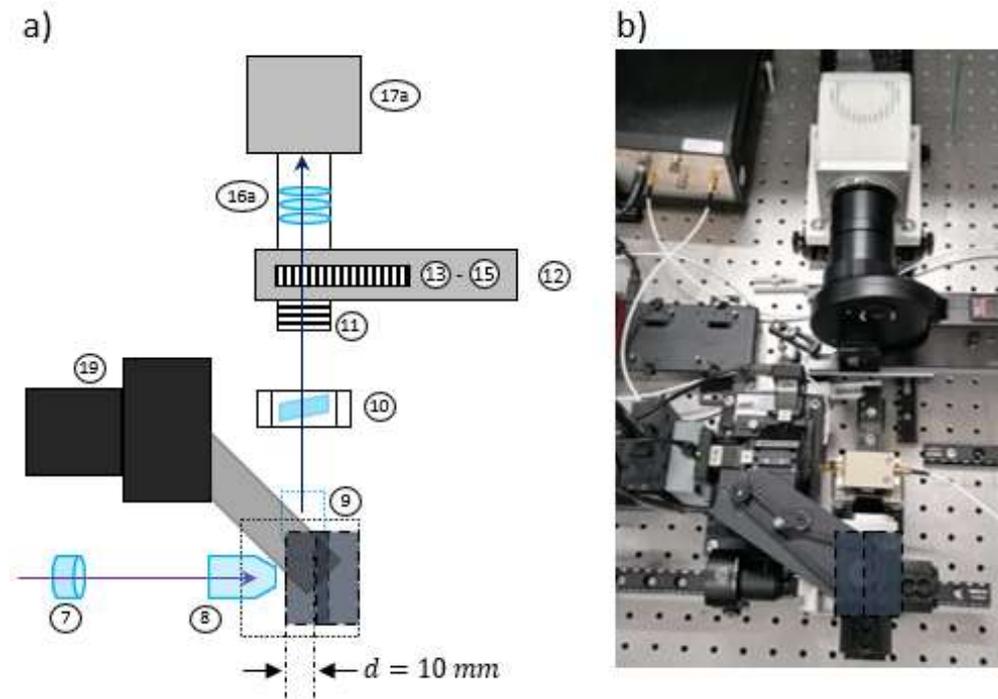


Abbildung 42: Positionierung über eine maximale Strecke von 10 mm bei einer Schrittweite von 10 μm (5 μm) des Strahlprofilmessgeräts in der Probenkammer zur Bestimmung der Lichtblattdicke a) als schematischer Darstellung und b) im realen Aufbau. Gepunktete Bauelemente werden für den Messaufbau demontiert. Die in der Zeichnung nummerierten Komponenten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Eine reale Messung des Beam Profilers ist in Abbildung 43 gezeigt. Die geometrischen Daten werden hierbei automatisch bestimmt. Die 2D-Ansicht des Lichtblatts zeigt die Form und die Intensitätsverteilung innerhalb des Lichtblatts.

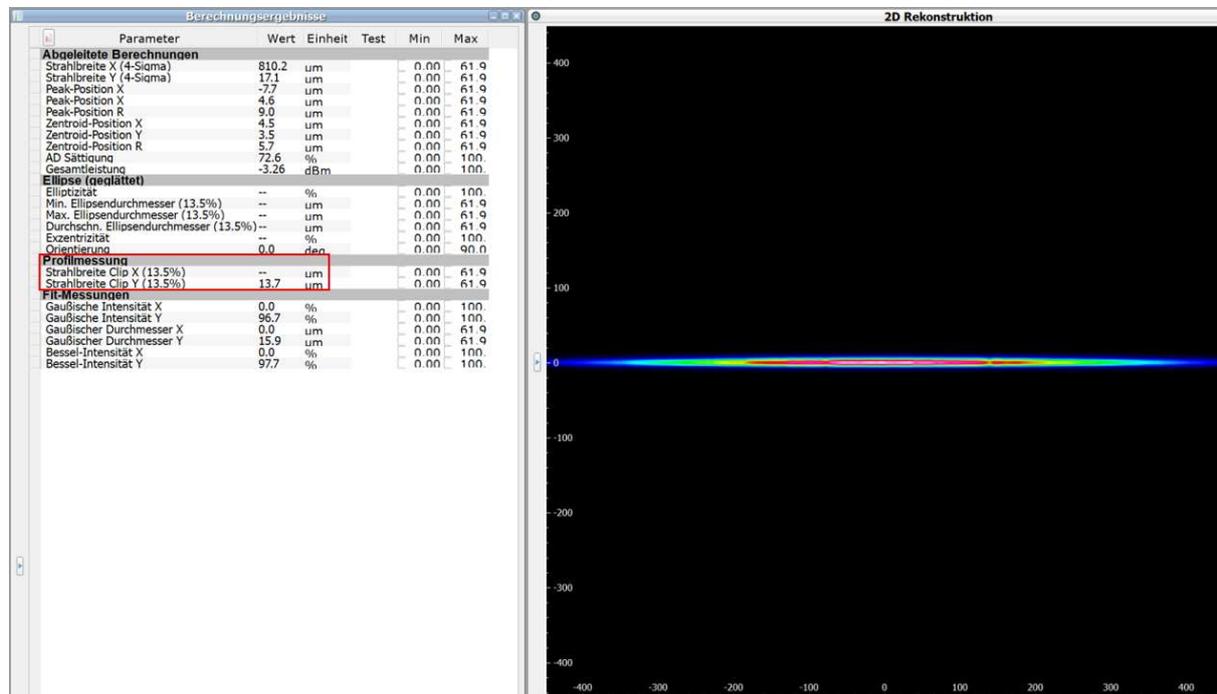


Abbildung 43: Beispielhafte reale Messung des Lichtblatts mit dem Beam Profilers. In den markierten Bereichen werden die relevanten Parameter der Lichtblattdicke entnommen.

Um eine Vergleichsanalyse zwischen den theoretischen Werten und den realen Messergebnissen anzustellen, wurden zunächst die theoretischen Werte, die für die Qualität des Lichtblatts maßgeblich sind aus Abbildung 2 gemäß der Formeln 1 bis 3, berechnet. Hierbei wurden Laser 1 mit einer Wellenlänge λ von 785 nm, einem Brechungsindex n von 1,33 durch die Wasserimmersionskammer und einer numerischen Apertur NA von 0,3 des Illuminationsobjektivs verwendet. Die berechnete theoretische Dicke des Lichtblatts ω_0 beträgt 1,11 μm . Zudem ergibt sich ein theoretisches Gesichtsfeld des Illuminationspfads (FOV_i) von 13,06 μm , dass durch das Doppelte der Rayleigh-Länge ($Z_r = 6,53 \mu\text{m}$) bestimmt wird. Die axiale Auflösung, definiert als das Doppelte der Lichtblattdicke ω_0 , beträgt 2,21 μm . Durch den Vergleich der theoretischen Werte mit den realen Messergebnissen können mögliche Abweichungen oder Fehler identifiziert werden. Diese Analyse ist von großer Bedeutung, um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der verwendeten Formel sowie der Messgeräte zu überprüfen und gegebenenfalls Anpassungen vorzunehmen, um genauere Ergebnisse zu erzielen.

Die Messungen zur Bestimmung der realen Lichtblattdicke von Laser 1 sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Messergebnisse wurden halbiert und auf der X-Achse dargestellt, um eine bessere Visualisierung zu ermöglichen. Der Graph zeigt die Messungen im relevanten

Bereich, in dem das Lichtblatt eine Dicke von 20 μm oder weniger aufweist. Die X-Achse repräsentiert die Position des Beam Profilers im Messaufbau. Aufgrund der Notwendigkeit einer Neukalibrierung des Beam Profilers nach jeder Messung weisen die Graphen geringfügige Unterschiede hinsichtlich dieser Position auf.

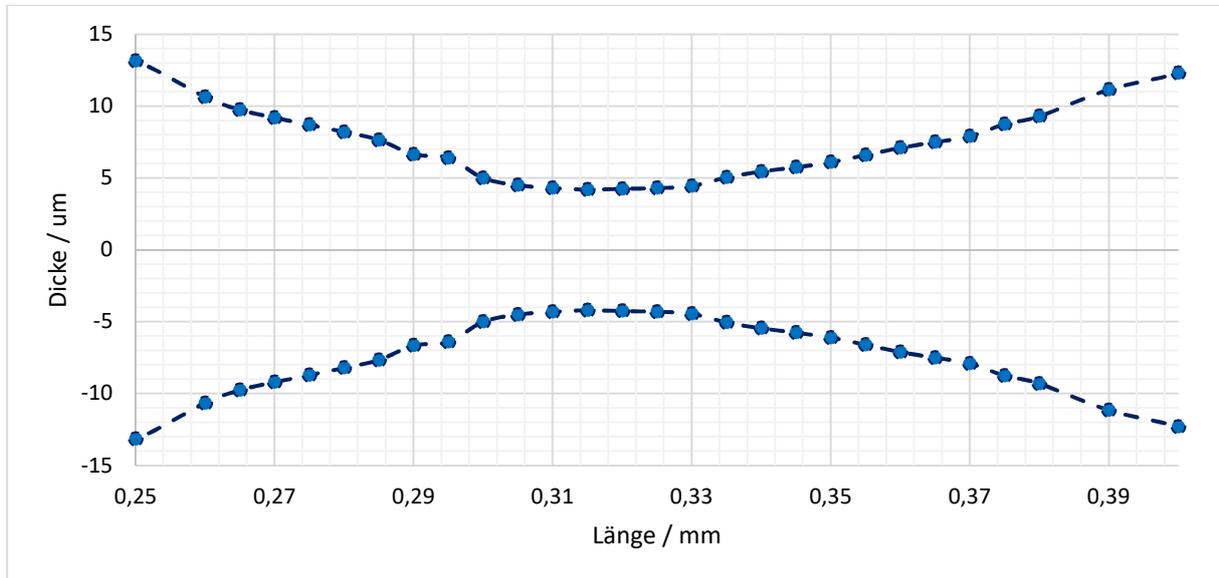


Abbildung 44: Dimensionen des Lichtblatts von Laser 1 (785 nm). Die Schrittweite unterhalb einer Lichtblattdicke von 20 μm beträgt 5 μm , darüber 10 μm . Der Referenzpunkt ist in der Mitte des Lichtblatts.¹²⁷

Das Lichtblatt, das von Laser 1 erzeugt wird, besitzt eine schmalste Taille von 8,4 μm , die bei einer Position von 0,315 mm gemessen wurde. Diese Taille entspricht gleichzeitig der axialen Auflösung des Lichtblatts. Das FOV_i wurde auf einen festen Wert von 65 μm bestimmt. Die Breite des Lichtblatts hängt von dem ursprünglichen Durchmesser des Laserstrahls ab und beträgt laut Angaben des Herstellers 1,22 mm.¹³⁵

Die Tabelle 10 präsentiert einen umfassenden Vergleich zwischen den theoretischen Werten, die durch Berechnungen ermittelt wurden, und den tatsächlich gemessenen Werten. Jeder Parameter wird in der Tabelle aufgeführt und mit seinem theoretischen Wert, der während der Berechnungen ermittelt wurde, sowie dem gemessenen Wert angegeben. Zusätzlich wird die Abweichung zwischen den beiden Werten angezeigt.

Tabelle 10: Unterschiede der geometrischen Parameter des LSRM von Laser 1 im Vergleich zu den theoretisch berechneten Werten.

Parameter	Theoretischer Wert	Gemessener Wert	Abweichung	Faktor	Formel
Lichtblattdicke ω_0	1,11 μm	4,2 μm	3,09 μm	2,78	(2)
Axiale Auflösung	2,21 μm	8,4 μm	6,19 μm	2,80	(3)
Rayleigh-Länge Z_r	6,53 μm	28 μm	21,47 μm	3,29	(1)
FOV_i	13,06 μm	65 μm	51,94 μm	3,98	(1)

Die gemessenen Ergebnisse weisen Abweichungen von den theoretisch berechneten Werten auf, wobei die Abweichungen einen Bereich zwischen dem Faktor 2,78 und 3,98 abdecken. Diese Abweichungen führen zu einer Verringerung der axialen Auflösung des Systems. Im konkreten Fall beträgt die gemessene axiale Auflösung $8,4 \mu\text{m}$, während die theoretisch berechnete Auflösung bei $2,21 \mu\text{m}$ liegt. Dies deutet darauf hin, dass die tatsächlich erzielte Auflösung gröber ist als erwartet. Allerdings ist zu beachten, dass das FOV_i sich auf $65 \mu\text{m}$ vergrößert und damit der Bereich, den das System gleichzeitig erfassen kann.

Bei der Untersuchung von Laser 2 bleiben die Parameter konstant, mit Ausnahme der Wellenlänge, die durch die Wellenlänge von Laser 2, $\lambda = 660 \text{ nm}$, ersetzt wird. Unter Verwendung dieser neuen Wellenlänge ergibt sich eine theoretische Dicke des Lichtblatts ω_0 von $0,93 \mu\text{m}$. Somit ergibt sich auch hier eine axiale Auflösung von $1,86 \mu\text{m}$. Die Rayleigh-Länge Z_r beträgt $5,49 \mu\text{m}$ und für das FOV_i ergibt sich ein Wert von $10,98 \mu\text{m}$. Die Messergebnisse von Laser 2 sind in Abbildung 45 dargestellt.

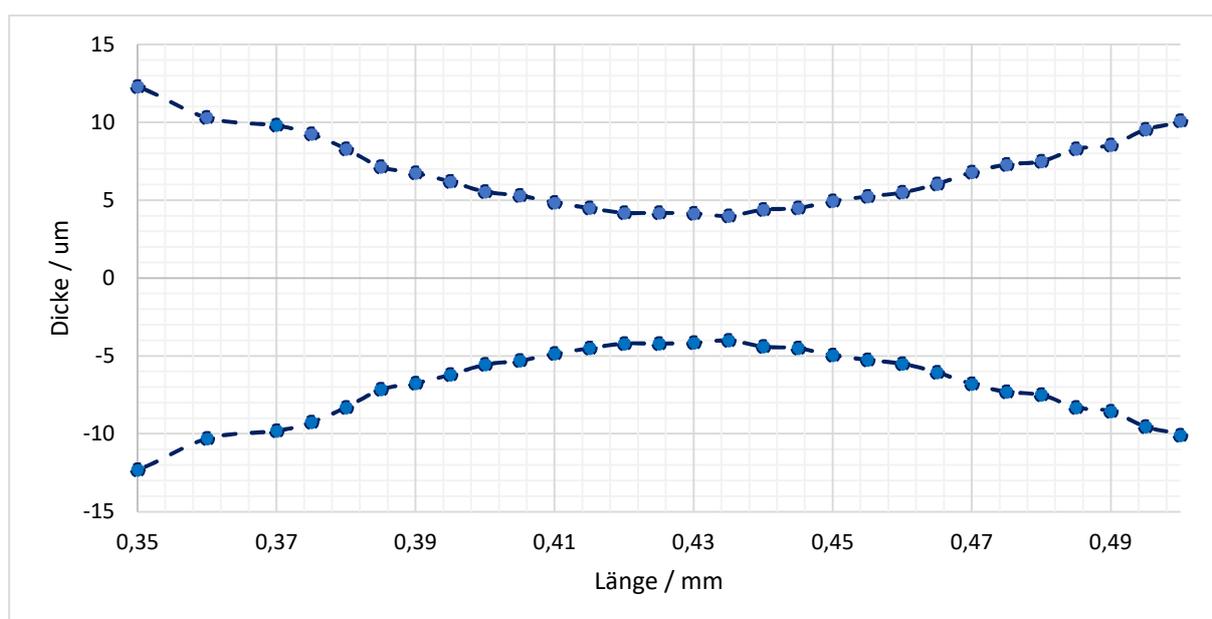


Abbildung 45: Dimensionen des Lichtblatts von Laser 2 (660 nm). Die Schrittweite unterhalb einer Lichtblattdicke von $20 \mu\text{m}$ beträgt $5 \mu\text{m}$, darüber $10 \mu\text{m}$. Der Referenzpunkt ist in der Mitte des Lichtblatts.¹²⁷

Das von Laser 2 erzeugte Lichtblatt hat eine axiale Auflösung von $8 \mu\text{m}$ (gemessen bei $0,435 \text{ mm}$). Mit $60 \mu\text{m}$ wird das FOV_i bestimmt. Die Breite des Lichtblatts entspricht dem Standarddurchmesser des Lasers und beträgt nach Datenblatt des Herstellers $1,45 \text{ mm}$.¹³⁵

In Tabelle 11 werden die gemessenen Werte mit den theoretisch berechneten Werten verglichen und die Abweichungen dargestellt. Die Tabelle bietet einen detaillierten Überblick über die verschiedenen Parameter und zeigt jeweils den theoretischen Wert, der während der Berechnung ermittelt wurde, sowie den gemessenen Wert.

Tabelle 11: Unterschiede der geometrischen Parameter des LSM von Laser 2 im Vergleich zu den theoretisch berechneten Werten.

Parameter	Theoretischer Wert	Gemessener Wert	Abweichung	Faktor	Formel
Lichtblattdicke ω_0	0,93 μm	4,0 μm	3,07 μm	3,30	(2)
Axiale Auflösung	1,86 μm	8,0 μm	6,14 μm	3,30	(3)
Rayleigh-Länge Z_r	5,49 μm	25 μm	19,51 μm	3,55	(1)
FOV_i	10,98 μm	60 μm	49,02 μm	4,46	(1)

Bei Laser 2 weichen die gemessenen Werte ebenfalls von den theoretisch berechneten Werten ab, wobei die Abweichungen im Bereich zwischen den Faktoren 3,3 und 4,46 liegen. Die axiale Auflösung erhöht sich von 1,86 μm auf 8,0 μm , was darauf hinweist, dass die tatsächlich erzielte Auflösung gröber ist als erwartet. Das FOV_i hingegen vergrößert sich von 10,98 μm auf 60 μm .

Trotz der signifikanten Abweichungen von den theoretischen Werten liegt die gemessene Auflösung immer noch im Bereich, in dem größere zelluläre Bestandteile detektiert werden können. Dies bedeutet, dass das System in der Lage ist, wichtige Informationen über größere zelluläre Strukturen zu generieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Dimensionen der beiden Lichtblätter ähnlich dimensioniert sind, was bedeutet, dass der gleiche Bildausschnitt betrachtet wird. Dies erleichtert den Vergleich und die Interpretation der Ergebnisse zwischen den beiden Lasern. Darüber hinaus ermöglicht das größere FOV_i eine umfassendere Darstellung und Analyse von zellulären Verbindungen. Die Erweiterung des betrachteten Bereichs ermöglicht Zusammenhänge und Beziehungen zwischen verschiedenen zellulären Strukturen besser zu identifizieren.

Durch die simultane Zündung beider Laser und die Projektion ihrer Lichtblätter in den Beam Profiler kann das kombinierte Lichtblatt beobachtet und analysiert werden. Dabei werden die Dimensionen des kombinierten Lichtblatts verwendet, um die Abweichungen der einzelnen Lichtblätter von Laser 1 und Laser 2 voneinander zu bestimmen. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich und eine quantitative Bewertung der Unterschiede zwischen den beiden Lichtblättern. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Messung des kombinierten Lichtblatts ist die Bestimmung der maximal beleuchteten Fläche innerhalb der Probe. Durch die Analyse der Ausdehnung des Lichtblatts kann abgeschätzt werden, wie groß der Bereich innerhalb der Probe ist, der von dem kombinierten Lichtblatt erfasst wird. Dies ist von großer Bedeutung, um die Wirksamkeit der Beleuchtung und die potenzielle Abdeckung wichtiger Bereiche der Probe zu beurteilen. Abbildung 46 bietet eine visuelle Darstellung des kombinierten Lichtblatts und ermöglicht die Bewertung der Abweichungen sowie der maximal beleuchteten Fläche, die durch die Kombination der beiden Laser erzielt werden.

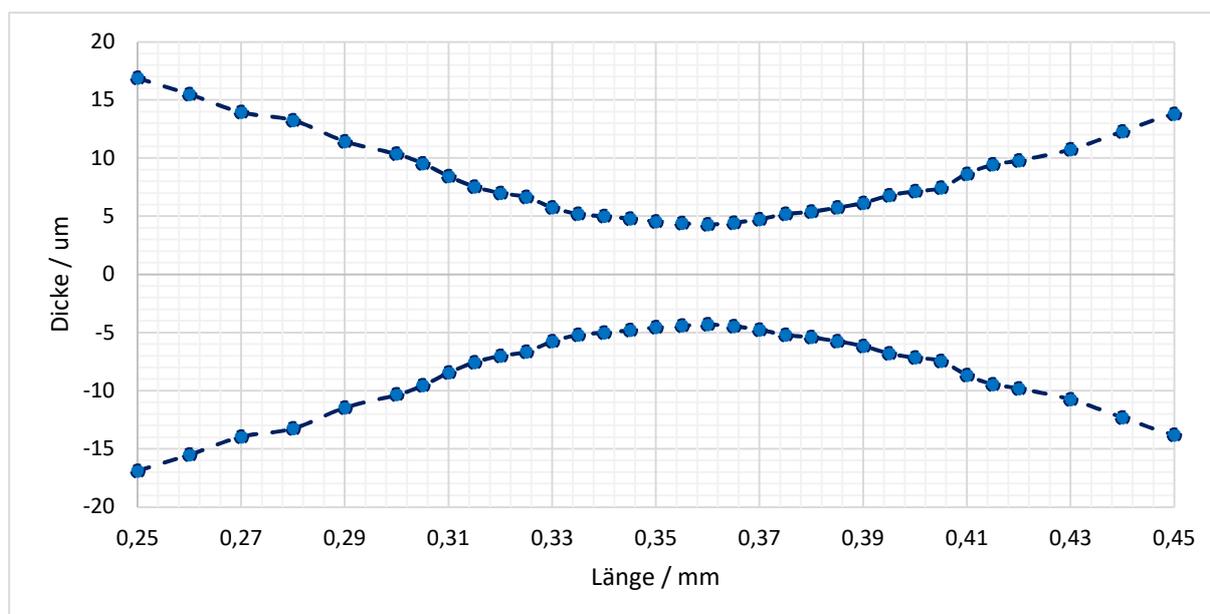


Abbildung 46: Dimensionen der kombinierten Lichtblätter von Laser 1 (785 nm) und Laser 2 (660 nm). Die Schrittweite unterhalb einer Lichtblattdicke von 20 μm beträgt 5 μm , darüber 10 μm . Der Referenzpunkt ist in der Mitte des Lichtblatts.¹²⁷

Das kombinierte Lichtblatt weist eine gemessene axiale Auflösung von 8,6 μm (gemessen bei 0,36 mm). Das FOV_i wird mit 65 μm bestimmt. Die Breite des Lichtblatts entspricht der Breite von Laser 2 und ist mit 1,45 mm beziffert.

Bei einer erwarteten kongruenten Ausrichtung der Lichtblätter wird eine Dicke des kombinierten Lichtblatts von 8,4 μm erwartet, was der Dicke des dickeren Lichtblatts von Laser 1 entspricht. Die tatsächlich gemessene Abweichung von 0,2 μm bei der Dicke des kombinierten Lichtblatts weist darauf hin, dass die Lichtblätter nicht vollständig kongruent sind und es eine Abweichung von 0,2 μm bei der Positionierung innerhalb der Probenkammer gibt. Dies bedeutet, dass die beiden Lichtblätter nicht exakt aufeinander ausgerichtet sind und es zu einer geringfügigen Verschiebung kommt, die zu dieser Abweichung führt. Diese Erkenntnis ist wichtig, um das Zusammenspiel der beiden Lichtblätter zu verstehen und mögliche Faktoren zu identifizieren, die zu solchen Abweichungen führen können. Eine präzise Ausrichtung und Positionierung der Lichtblätter sind entscheidend, um die gewünschte Bildqualität und Genauigkeit in der Zellforschung und -analyse zu gewährleisten.

Tatsächlich ist diese geringe Abweichung zwischen den Lichtblättern von Laser 1 und Laser 2 verkraftbar, da die hohe axiale Auflösung dazu führt, dass ein Großteil der Bilder übereinander liegt und diese geringe Abweichung das Gesamtbild nicht signifikant beeinflusst, sondern der gleiche Schnitt der Probe beleuchtet wird. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung, da sie bestätigt, dass die Lichtblätter trotz der geringen Abweichung nahezu kongruent sind und einen gemeinsamen Beleuchtungsbereich der Probe ermöglichen. Dies ist entscheidend, um konsistente und vergleichbare Ergebnisse in der Zellforschung und -analyse zu erzielen. Die Tatsache, dass die Lichtblätter den gleichen Schnitt beleuchten, gewährleistet eine einheitliche

und zuverlässige Abbildung der zellulären Strukturen und ermöglicht eine präzise Analyse der Probe.

Es ist wichtig anzumerken, dass trotz der geringfügigen Abweichungen in der Positionierung der Lichtblätter die Auswirkungen auf die Bildqualität und die Analyseergebnisse minimal sind. Die hohe axiale Auflösung und die nahezu kongruente Ausrichtung der Lichtblätter ermöglichen weiterhin eine zuverlässige Erfassung und Darstellung der relevanten zellulären Informationen.

3.1.6 Verfahrengenauigkeit und Schrittweite der 4D-Verfahreinheit

Die Verfahrengenauigkeit und Schrittweite der einzelnen Achsen werden unter Verwendung einer digitalen Messuhr (MarCator 1086R, Mahr GmbH, Deutschland) mit einer Auflösung von 0,0001 mm bestimmt. Die Messuhr wird auf einem Laborstativ befestigt und individuell an die verschiedenen Achsen positioniert. Abbildung 47 zeigt die isometrische Darstellung der Verfahreinheit als CAD-Modell sowie den realen Aufbau mit dem entsprechenden Koordinatensystem.

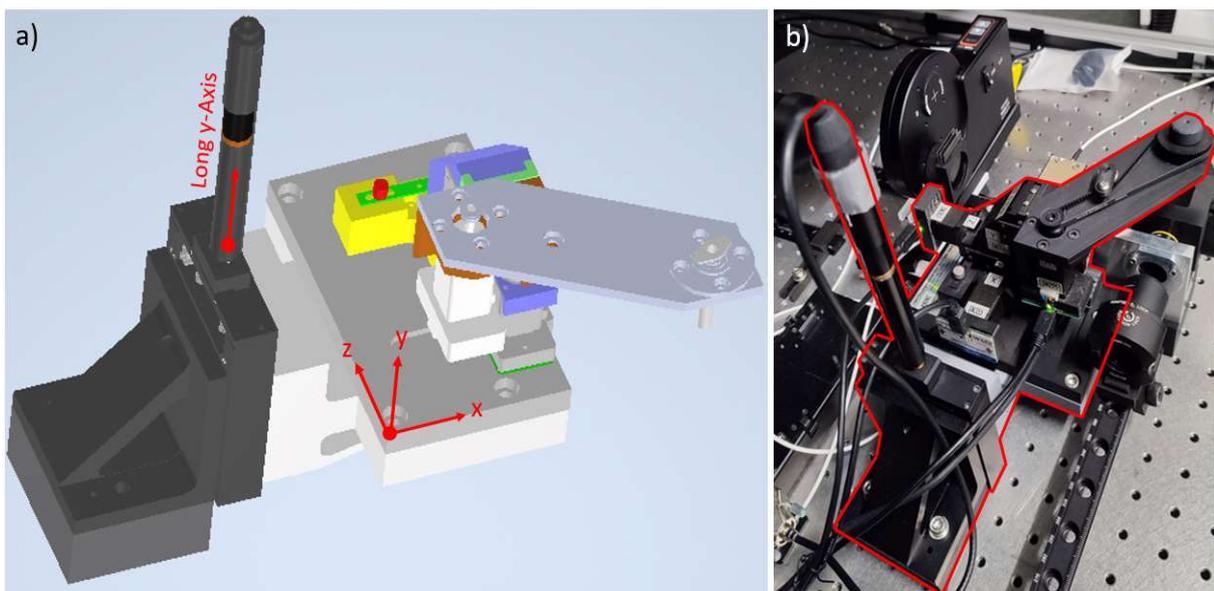


Abbildung 47: Zentrale Verfahreinheit des LSM in a) isometrischer Darstellung mit eingezeichnetem Koordinatensystem und Achsenbezeichnung und b) realer Darstellung.

Vor der Aufnahme der Messdaten werden die Achsen von fest definierten Startpunkten aus positioniert. Eine Homing-Funktion bringt die Achsen automatisch zu den vom Hersteller festgelegten Endpunkten, die als Nullpunkte bezeichnet werden. Ausgehend von den Nullpunkten werden die Startpunkte für die Messungen angefahren. Dabei erfolgt die Messung entlang desselben Richtungsvektors wie beim Anfahren des Startpunkts, um Umkehrspiel (ein Fehler bei der Positionierung aufgrund der Richtungsumkehr) zu vermeiden. Nach der Messung wird die Achse um 5 mm über den Startpunkt hinausbewegt und dann wieder zurück

auf den Startpunkt, um sicherzustellen, dass alle Messungen denselben Richtungsvektor aufweisen und das Spiel vermieden wird. Dieser Ablauf wird vor jeder Messreihe wiederholt, um konsistente Daten zu generieren. Die Achsen der Verfahreinheit werden von Schrittmotoren angetrieben. Zur Bestimmung der tatsächlichen Schrittweite und Verfahrgenauigkeit der einzelnen Achsen werden unterschiedliche Anzahlen von Schritten durchgeführt. In Tabelle 12 sind die einzelnen Messparameter aufgeführt. Durch diese Messungen werden wichtige Informationen über die Verfahrgenauigkeit und Schrittweite der Achsen gewonnen. Sie dienen dazu, die Leistung und Präzision der Verfahreinheit zu charakterisieren und sicherzustellen, dass sie den Anforderungen der Anwendung gerecht wird.

Tabelle 12: Übersicht der einzelnen Messparameter zur Bestimmung der Verfahrgenauigkeit der Achsen.

	Messreihe 1	Messreihe 2	Messreihe 3
Schrittgröße	1	2	4
Anzahl der Schritte	10	10	10
Gesamtstrecke / Schritte	10	20	40
Iterationen	3	3	3

Die relative Abweichung wird zur Bestimmung der Verfahrgenauigkeit verwendet und basiert auf der durchschnittlichen Schrittweite in Mikrometern. In Abbildung 48 werden die Messdaten für die x-Achse dargestellt. Die rot markierte Linie repräsentiert den Mittelwert der einzelnen Messergebnisse, während die rot markierten Balken die Streuung um den Mittelwert anzeigen. Anhand dieser Werte kann die Verfahrgenauigkeit der x-Achse beurteilt werden.

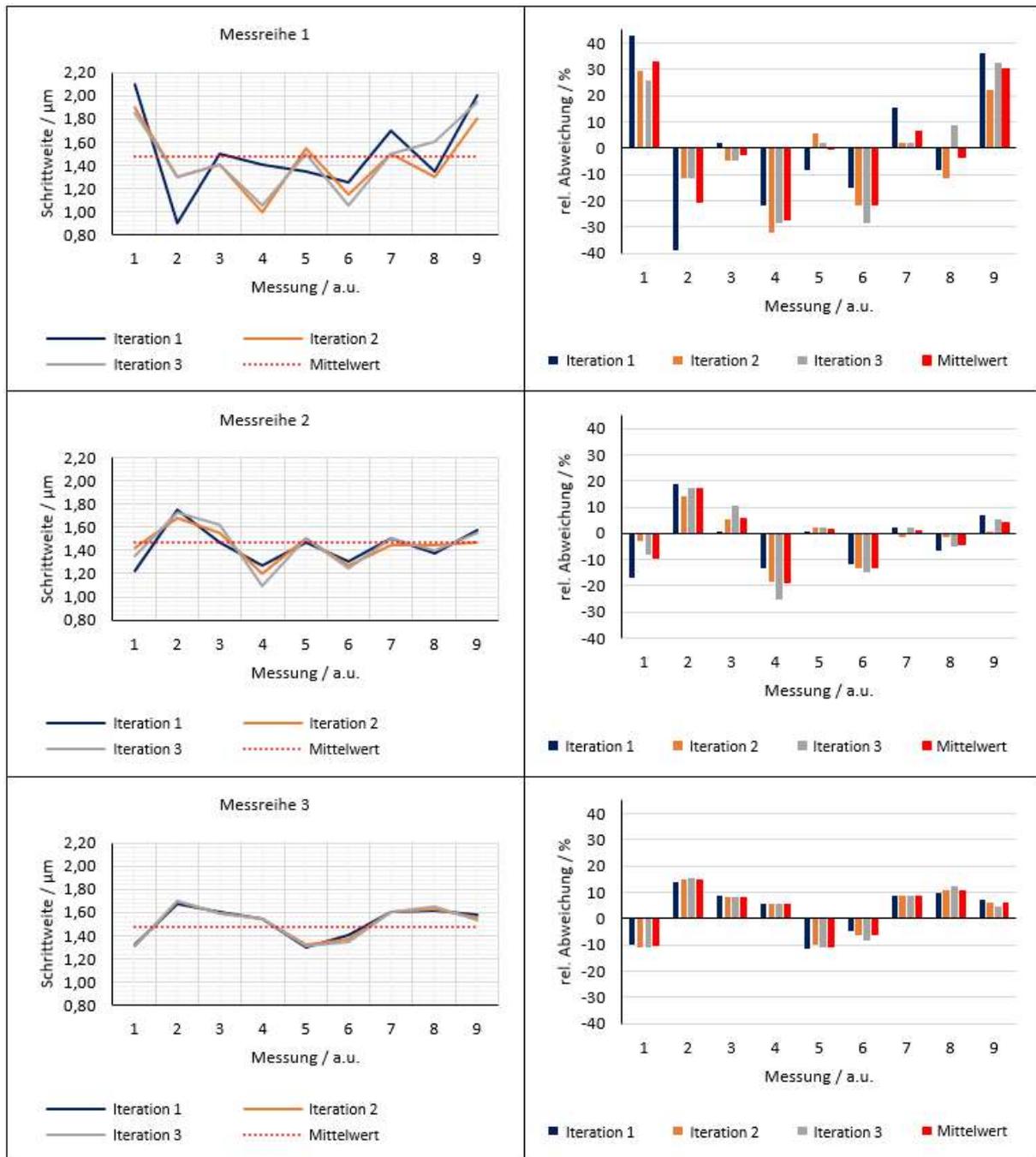


Abbildung 48: Ergebnisse der Messdatenerfassung zur Bestimmung der Schrittweite und Verfahrengenauigkeit der x-Achse über die in Tabelle 12 beschriebenen Messparameter. Die rote Linie und die roten Balken zeigen jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Parameter.

Die berechnete mittlere Schrittweite der Messungen der x-Achse beträgt $1,47 \mu\text{m}$ über alle drei Messreihen. Messreihe 1 zeigt eine durchschnittliche relative Abweichung zwischen -28% und $+32 \%$ bezogen auf den durchschnittlichen Mittelwert der Schritte der x-Achse auf. In Messreihe 2 ist eine Abweichung zwischen -18% und $+18 \%$ ersichtlich und bei Messreihe 3 bewegt sich die Abweichung zwischen -10% und $+14 \%$ mittlere relative Abweichung. Anhand der Entwicklung der relativen Abweichung sowie der Darstellung der Messdaten ist zu erkennen, dass sich bei höherer Schrittzahl ein stabileres Verhalten hinsichtlich der

Wiederholgenauigkeit der x-Achse einstellt. In Abbildung 49 sind die Messwerte der einzelnen Messreihen zur y-Achse dargestellt, die für die Positionierung der Probe zuständig ist.

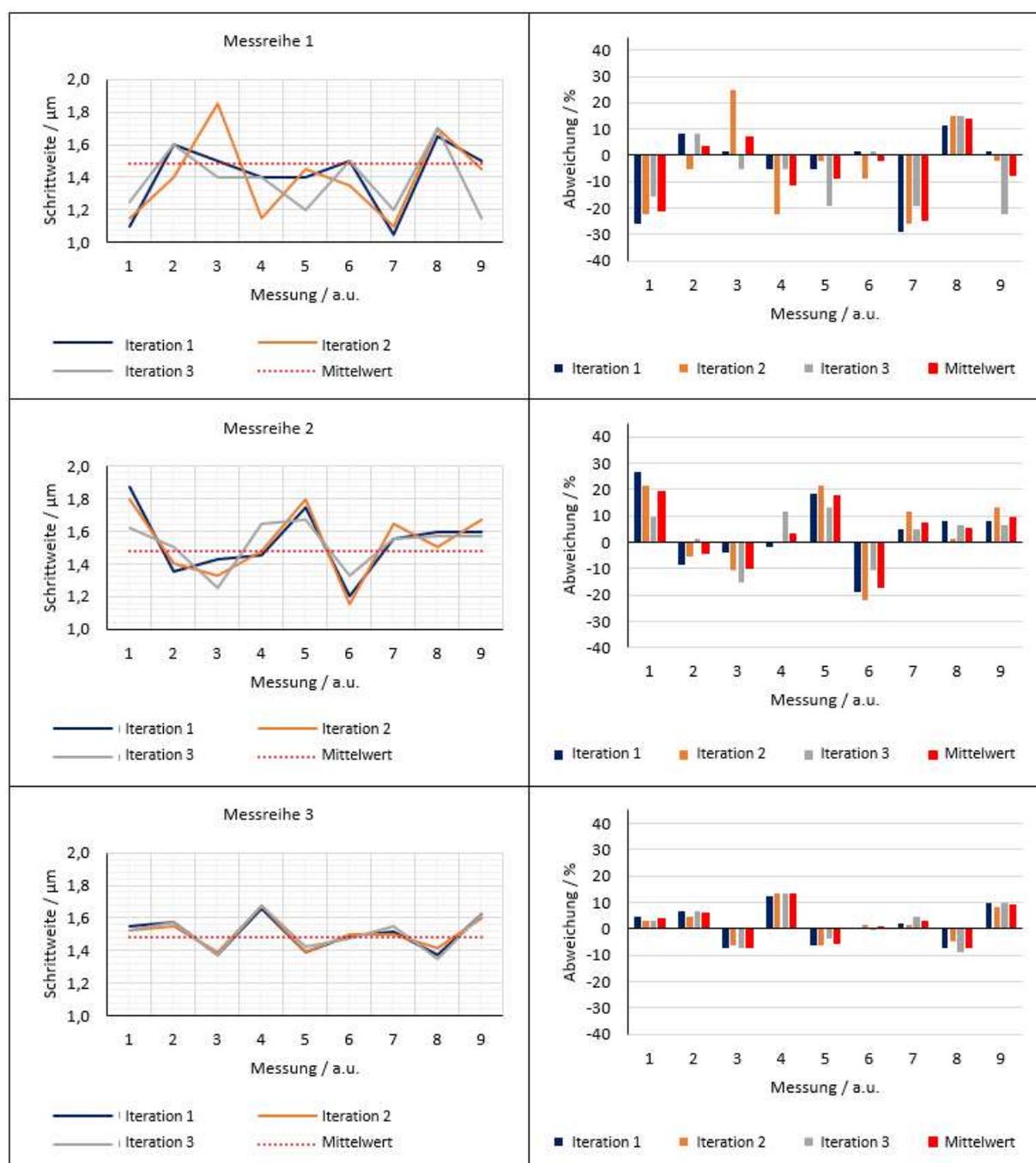


Abbildung 49: Ergebnisse der Messdatenerfassung zur Bestimmung der Schrittweite und Verfahrensgenauigkeit der y-Achse über die in Tabelle 12 beschriebenen Messparameter. Die rote Linie und die roten Balken zeigen jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Parameter.

Die mittlere Schrittweite der y-Achse beträgt $1,48 \mu\text{m}$. Die durchschnittliche relative Abweichung von Messreihe 1 bezogen auf den errechneten Mittelwert aller Messungen liegt zwischen -24% und $+13 \%$. Bei Messreihe 2 liegt diese Abweichung zwischen -17% und $+20 \%$ und bei Messreihe 3 zwischen -7% und $+12 \%$. Auch hier ist ersichtlich, dass eine größere

Schrittzahl ein stabileres Wiederholverhalten der Achse aufweist. Zudem sind die Schwankungen der Abweichung bei größerer Schrittzahl um bis zu 17 % geringer.

Die Messwerte der einzelnen Messreihen der z-Achse, zuständig für die Schnittebenen bei der Bildaufnahme, sind in Abbildung 50 dargestellt.

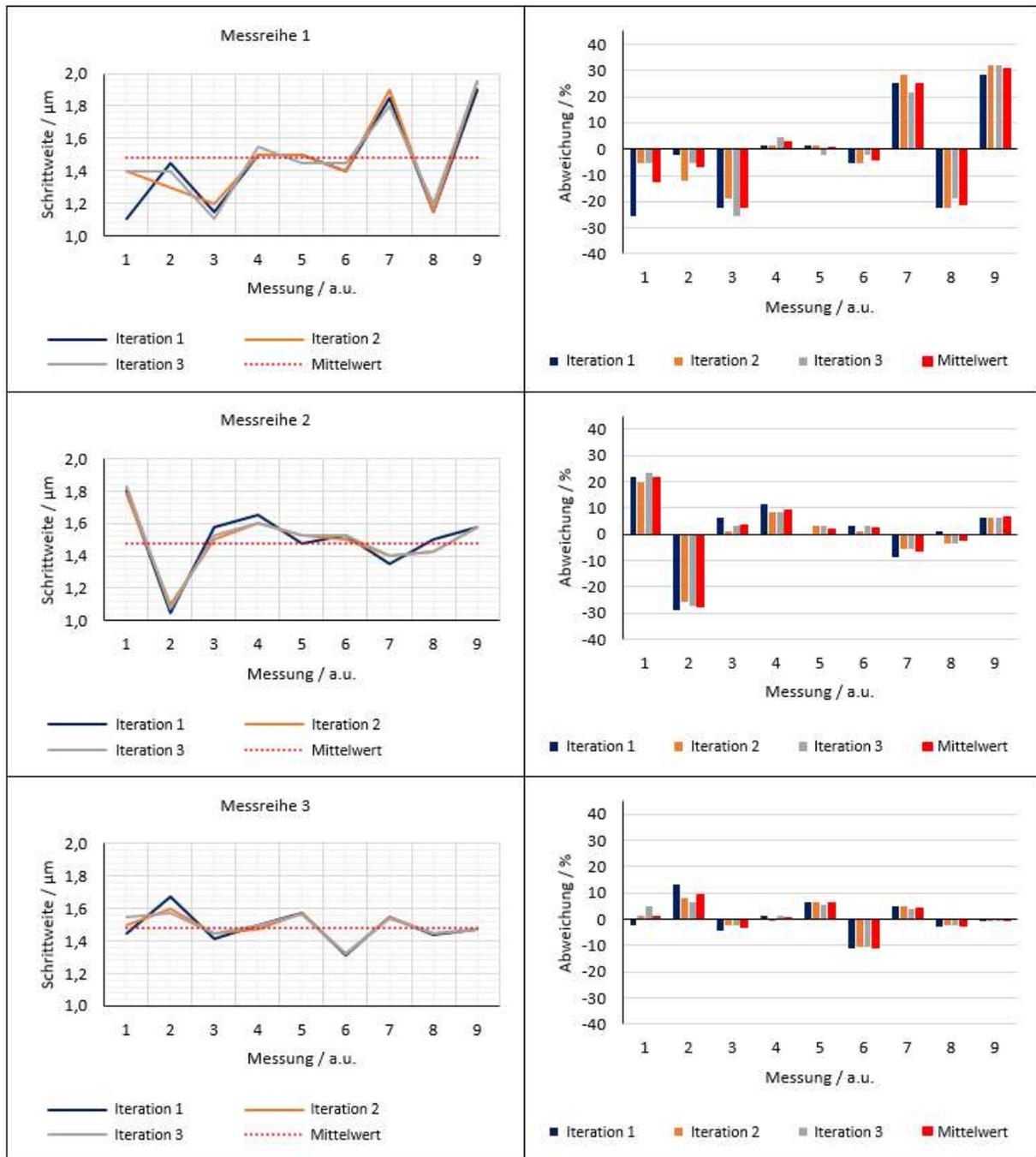


Abbildung 50: Ergebnisse der Messdatenerfassung zur Bestimmung der Schrittweite und Verfahrensgenauigkeit der z-Achse über die in Tabelle 12 beschriebenen Messparameter. Die rote Linie und die roten Balken zeigen jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Parameter.

Die berechnete mittlere Schrittweite der Messungen der x-Achse beträgt 1,47 μm . Die relative Abweichung von Messreihe 1 liegt zwischen -22 % und +31 %. Wie bei der x- und y-Achse

ebenfalls festzustellen, nimmt die relative Abweichung bei größeren Schrittweiten ab. So beträgt diese in Messreihe 2 zwischen -27 und +22 % und in Messreihe 3 zwischen -11 % und +9 %.

In Abbildung 51 werden die Resultate der Messreihen zur Bestimmung der durchschnittlichen Schrittweite und Verfahrensgenauigkeit für die Long y-Axis, zuständig für die Grobpositionierung der Probe, gezeigt.

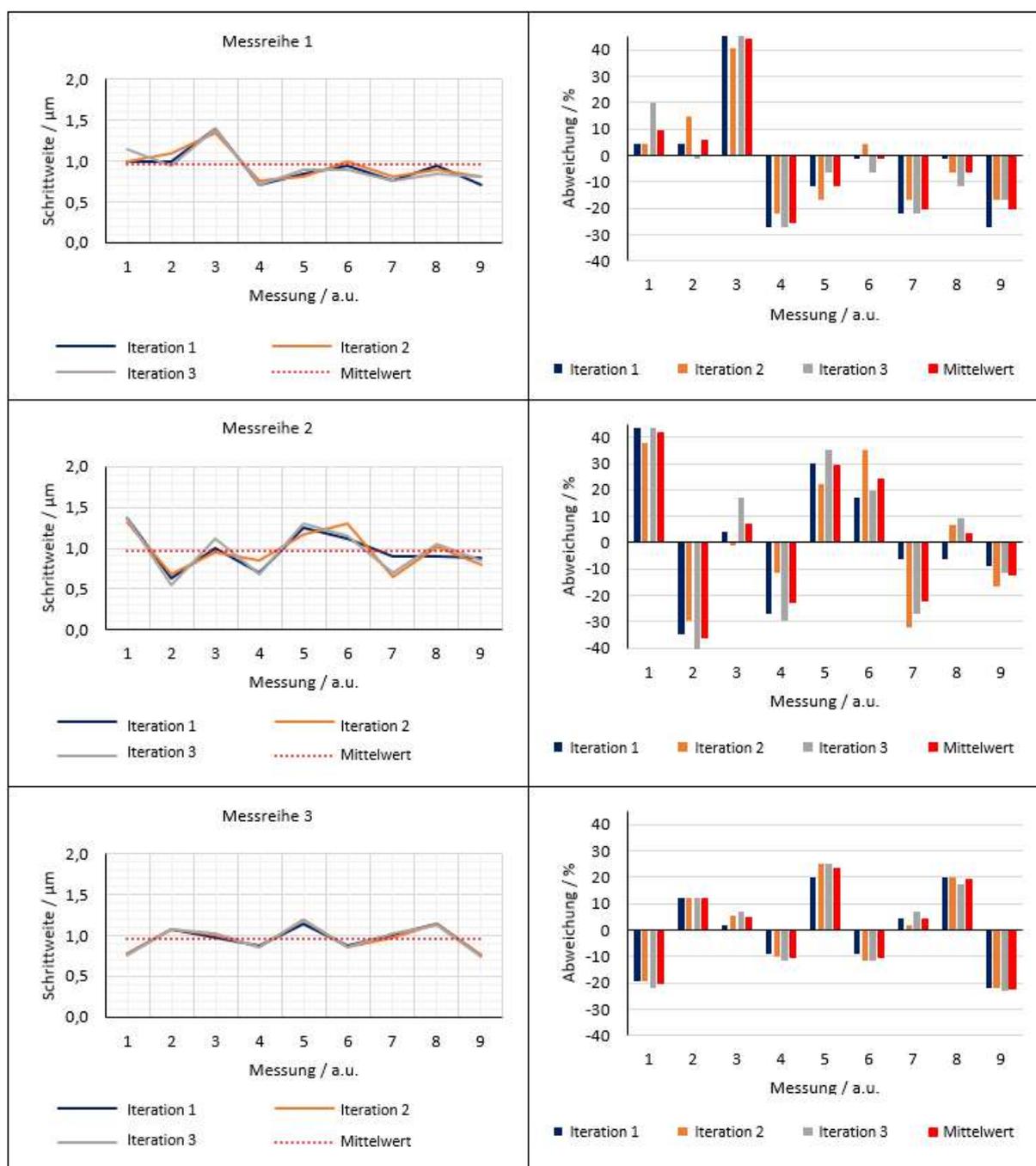


Abbildung 51: Ergebnisse der Messdatenerfassung zur Bestimmung der Schrittweite und Verfahrensgenauigkeit der Long y-Axis über die in Tabelle 12 beschriebenen Messparameter. Die rote Linie und die roten Balken zeigen jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Parameter.

Da die Long y-Axis ein anderes Verfahrensystem ist, ändern sich die Messresultate. Die mittlere berechnete Schrittweite wird mit $0,96 \mu\text{m}$ errechnet. Die mittlere relative Abweichung bezogen auf den errechneten Mittelwert von Messreihe 1 liegt im Bereich von -26% bis $+42 \%$. In Messreihe 2 ergibt sich eine Spanne zwischen -36% und $+41 \%$. Das Resultat der von Messreihe 3 zwischen -21 und $+22 \%$. Obwohl die Achse von einem anderen Hersteller ist, lässt sich auch hier feststellen, dass eine größere Schrittzahl zu einem stabileren Verhalten der Achse hinsichtlich Verfahrengenauigkeit und Wiederholbarkeit führt. In Abbildung 52 sind die Standardabweichungen der einzelnen Achsen über alle Messreihen dargestellt.

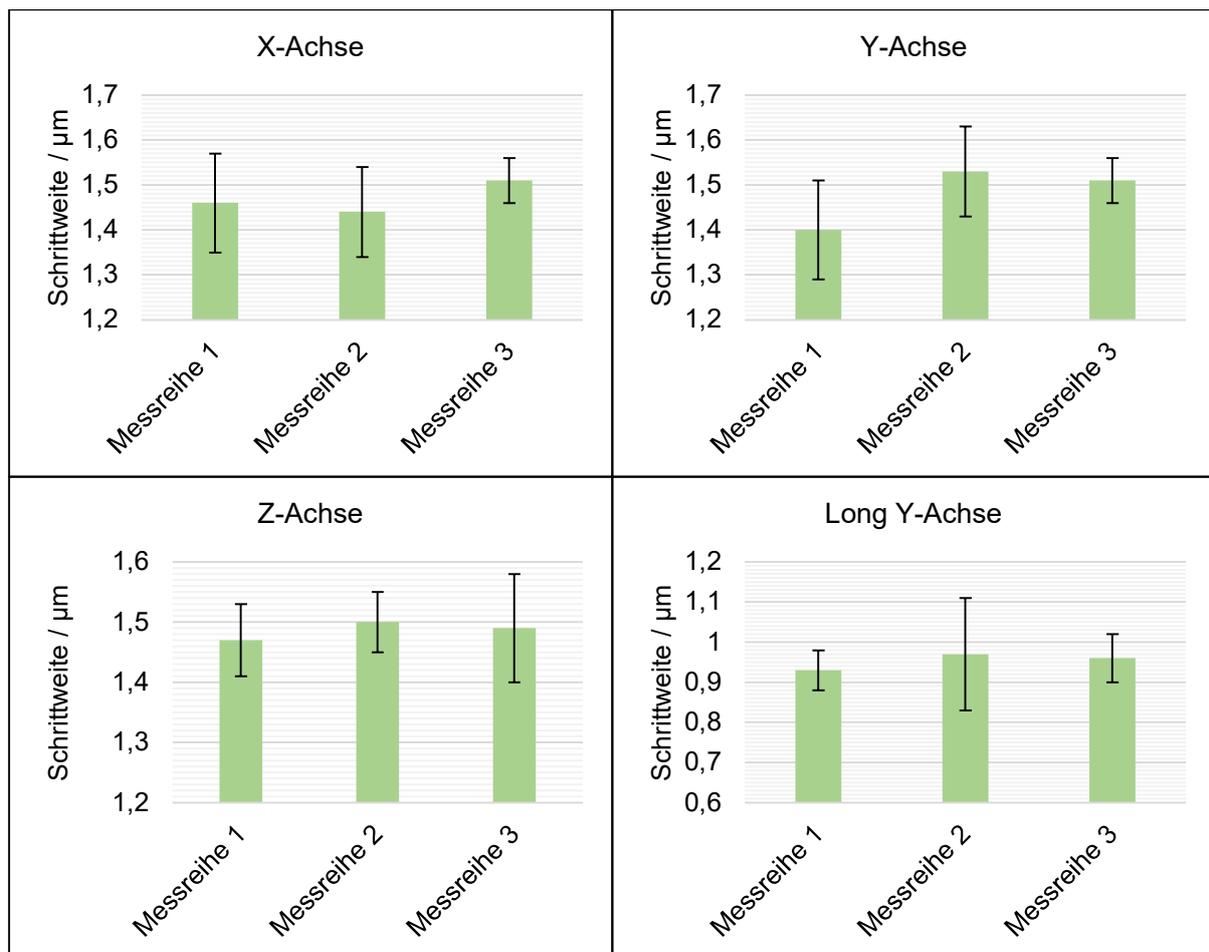


Abbildung 52: Standardabweichungen der einzelnen Messungen bei der Bestimmung der Verfahrengenauigkeit der einzelnen Achsen.

Die Standardabweichungen der einzelnen Achsen bewegen sich innerhalb eines Bereichs von $\pm 0,14 \mu\text{m}$ (bei Messreihe 2 der Long Y-Achse), was darauf hinweist, dass die Messwerte bei allen Achsen nah um den Mittelwert verteilt sind. Die Ausnahme bildet hierbei die Z-Achse. In Messreihe 3 zeigt sich bei den einzelnen Messungen die geringste Standardabweichung von $\pm 0,05 \mu\text{m}$ für die X- und Y-Achse, was auf eine hohe Präzision bei diesen Achsen hinweist. Bei Messreihe 3 werden größere Schrittzahlen verwendet, und die Daten zeigen eine maximale Standardabweichung von $\pm 0,06 \mu\text{m}$ für die Long Y-Achse. Dies deutet darauf hin,

dass größere Strecken präziser und reproduzierbarer angefahren werden können. Dennoch sind auch kurze Strecken sehr präzise anfahrbar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Messungen zur Verfahrengenauigkeit und Schrittweite der Verfahrenseinheit nahezu identische Ergebnisse für die x-, y- und z-Achse liefern. Die mittleren Schrittweiten weisen nur minimale Unterschiede auf und können als gleichwertig betrachtet werden. Es wurde festgestellt, dass eine größere Anzahl von Schritten zu stabileren Ergebnissen führt. Die Unterschiede in den relativen Abweichungen sind gering und liegen bei einer Schrittweite von 4 zwischen -4 % und +4 %, was einer absoluten Differenz von $\pm 0,06 \mu\text{m}$ entspricht. Die Standardabweichungen bestätigen diese Beobachtung, da die geringsten Abweichungen bei größeren Schrittweiten festgestellt wurden. Somit zeigt sich, dass eine höhere Schrittzahl zu einer stabileren Verfahrenseinheit und zuverlässigeren wiederholten Positionierfahrten führt. Bei kleineren Schrittweiten sind die Achsen weniger präzise, was zu Verschiebungen in der Bildgebung führen kann. Dies gilt auch für die Long Y-Achse, die eine kleinere Schrittweite von $0,96 \mu\text{m}$ aufweist und bei 4 Schritten eine maximale absolute Abweichung von $0,21 \mu\text{m}$ aufweisen kann.

3.1.7 Bandbreite und Wiederholgenauigkeit des AOTFs

Das zentrale Element zur Selektion der zu untersuchenden Bereiche ist der AOTF. Die Funktionalität des LSRM wird demnach durch die selektiven Bandbreite und der Wiederholgenauigkeit beeinflusst. Für die Bestimmung der beiden Parameter wird eine Weißlichtquelle am Eingang des AOTFs installiert. Über einen Kolimator wird das Licht im Freistrah durch die Eingangsöffnung des AOTFs geleitet. Zur Detektion der einzelnen Bereiche über den vollständigen Arbeitsbereich des AOTFs (550 – 1100 nm) werden zwei Raman-Spektrometer und ein UV/VIS-Spektrometer angeschlossen. Das Spektrometer RXN1 (Kaiser Optical Systems Inc, USA), deckt den Bereich zwischen 535 bis 780 nm ab, das Spektrometer MultiSpec® Raman (Tec5 AG, Deutschland) den Bereich zwischen 785 und 1100 nm. Die Auswahl der Ramanspektrometer als Detektoren erfolgte aufgrund der deutlich besseren Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen Spektrometern. So ist die Auflösung des Kaisergeräts bei $0,1 \text{ nm}$ (1 cm^{-1}) und die des Tec5-Geräts bei $0,2 \text{ nm}$ (3 cm^{-1}), wohingegen die Auflösung bei dem MCS 601 UV-NIR-Spektrometer (Carl Zeiss AG, Deutschland) bei $0,5 \text{ nm}$ (10 cm^{-1}) liegt. Das Zeiss-Spektrometer wird für die Aufnahme großer Spektralbereiche zwischen 500 und 950 nm verwendet und dient primär der Aufnahme der Weißlichtquelle sowie der Grobbestimmung der Bandbreite des AOTFs.

Im ersten Schritt wird das Spektrum und die Intensitätsverteilung der Weißlichtquelle mit dem MCS 601 Spektrometer bestimmt. Mit einem 30 dB-Dämpfungsglied zur Vermeidung der Übersteuerung des Spektrometers wird die Intensität reduziert. Abbildung 53 zeigt das Ergebniss der Mesung bei einer Integrationszeit von 1000 ms.

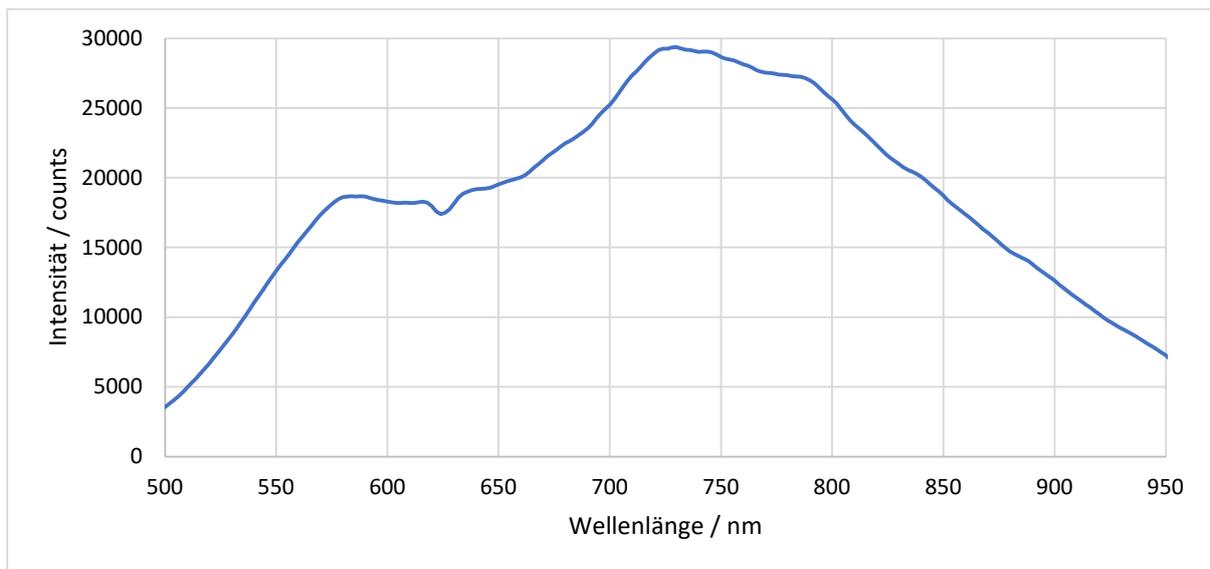


Abbildung 53: Optisches Spektrum und Intensitätsverteilung der verwendeten Weißlichtquelle, gemessen mit dem MCS 601 UV-NIR-Spektrometer der Carl Zeiss AG.

Das Spektrum der Weißlichtquelle zeigt, dass sie den gesamten Funktionsbereich des AOTF abdeckt und somit für die weiteren Versuche geeignet ist. In der ersten Messreihe liegt der Fokus auf der Bestimmung der Bandbreite des AOTFs im Bereich von 600 bis 850 nm. Die Weißlichtquelle wird auf der Anregungsseite positioniert, während das Zeiss UV/VIS-Kombigerät auf der Detektionsseite angeschlossen wird. Gemäß den Messmodalitäten wird alle 10 nm eine Messung mit einer Integrationszeit von 500 ms durchgeführt. Neben der Bandbreitenmessung wird in diesem Versuch auch die Abweichung zwischen der in der AOTF-Software eingestellten Wellenlänge und der tatsächlich gemessenen zentralen Wellenlänge untersucht und verifiziert. Um eine bessere Vergleichbarkeit der zentralen Wellenlänge und der Bandbreite der Peaks zu gewährleisten, werden die Messergebnisse in Abbildung 54 mit normierten Intensitäten dargestellt.

Diese Messungen ermöglichen eine detaillierte Charakterisierung der Leistung des AOTFs und liefern wichtige Informationen über die Bandbreite und die Abweichung der zentralen Wellenlänge. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind von entscheidender Bedeutung für die korrekte Einstellung und Nutzung des AOTFs in zukünftigen Experimenten und Anwendungen.

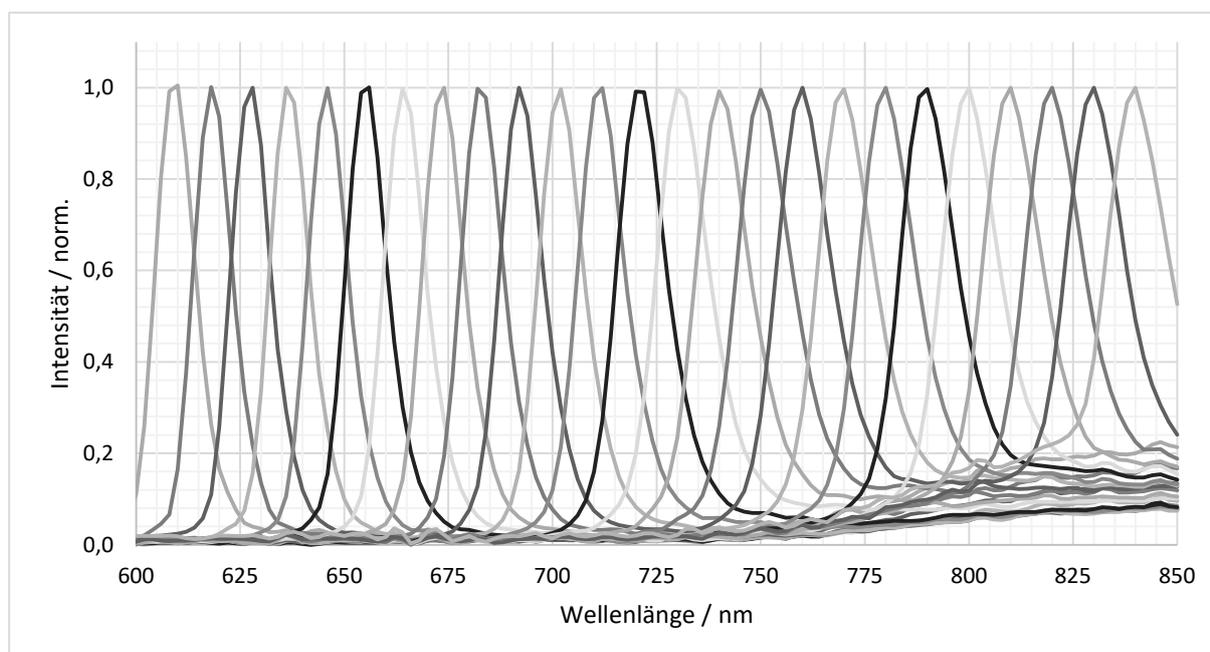


Abbildung 54: Ergebnisse der Grobbestimmung von Bandbreite und Wellenlängendivergenz des AOTFs bei einem Spektrum von 600 bis 850 nm. Gemessen wurde mit dem MCS 601 UV-NIR-Spektrometer von Carl Zeiss AG bei einer Schrittweite von 10 nm und einer Integrationszeit von 500 ms.

Das Resultat der Grobmessung des AOTFs bezüglich der Einstellgenauigkeit zeigt eine Divergenz zwischen eingestellter und realer Wellenlänge des AOTFs. Tabelle 13 gibt die Ergebnisse der einzelnen Bereiche wieder. Aufgrund der relativ großen Auflösung von 3 nm des UV/VIS-Spektrometers lassen sich bei dieser Messung keine adäquaten Aussagen über die Bandbreite des AOTFs treffen.

Tabelle 13: Abweichung des AOTFs von der eingestellten Wellenlänge bezogen auf den entsprechenden Bereich.

Wellenlängenbereich/ nm	Abweichung / nm
600 – 650	3 – 5
660 – 740	1 – 2
750 – 810	0 – 1
820 – 850	1 – 2

Für eine präzisere Betrachtung der Bandbreite des AOTFs in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen werden zwei Raman-Spektrometer an den AOTF angeschlossen und die Messparameter entsprechend des vom Spektrometer vorgegebenen Wellenlängenbereichs eingestellt. Für den Bereich von 590 bis 660 nm wird der AOTF mit einer Schrittweite von 5 nm verfahren bei einer Integrationszeit von 500 ms. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt.

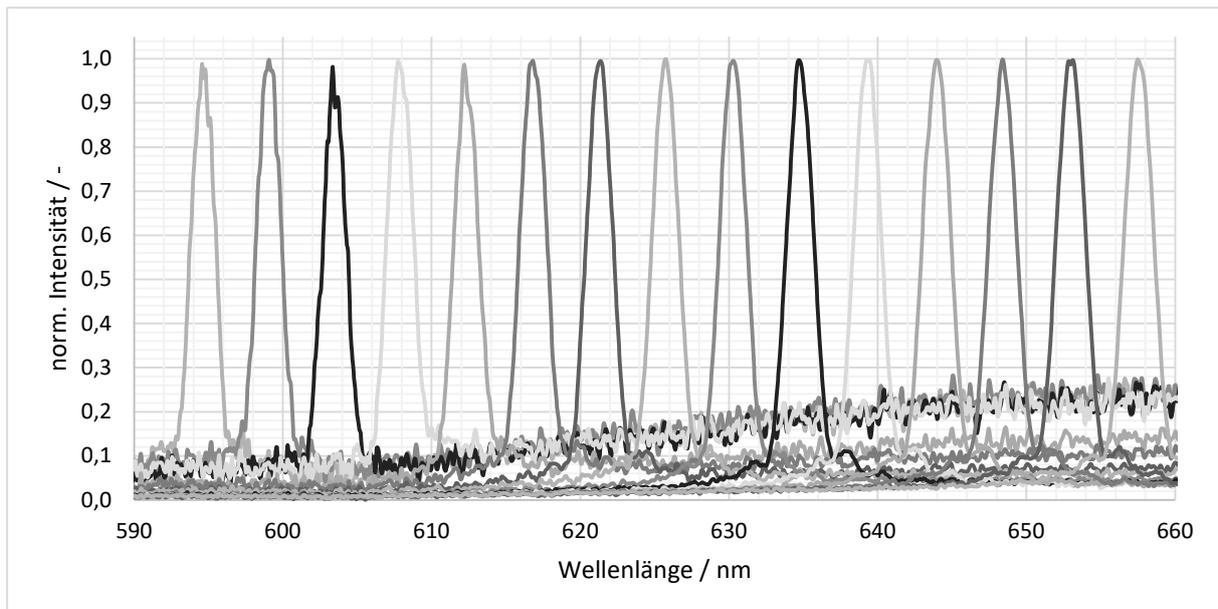


Abbildung 55: Verfahrensgenauigkeit und Bandbreite des AOTFs im Bereich 590 bis 660 nm gemessen mit dem Spektrometer RXN1-532 von Kaiser Optical Systems Inc. bei einer Schrittweite von 5 nm.

Die Bandbreite des AOTFs im Bereich zwischen 590 und 660 nm lässt sich über den gesamten Bereich mit 3 nm detektieren. Die gemessene Wellenlänge weicht um 2 bis 3 nm, je nach Messpunkt, von der eingestellten Wellenlänge ab. Dies entspricht den zuvor aufgenommenen Abweichungen bei der ersten Messung des AOTFs. Bedingt durch die Normierung der Signale ist ab 620 nm ein steigendes Rauschsignal zu erkennen. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Intensitätsverteilungen der Weißlichtquelle und der daraus resultierenden unterschiedlichen Signalverläufe über den Messbereich.

Die nächste Messung überprüft die Abweichung zwischen Soll- und Ist-Wert des AOTF beim Verfahren mit einer kleineren Schrittweite. Im Bereich zwischen 665 und 690 nm wird mit einer Schrittweite von 2 nm verfahren, was der kleinsten Schrittweite des AOTFs entspricht. Eine Schrittweite von 1 nm kann nur über den „Umweg“ 3 nm erreicht werden, indem zuerst 3 nm vorwärts und anschließend 2 nm rückwärts verfahren wird. Abbildung 56 zeigt die Ergebnisse der Messung kleinstmöglicher Schrittweite.

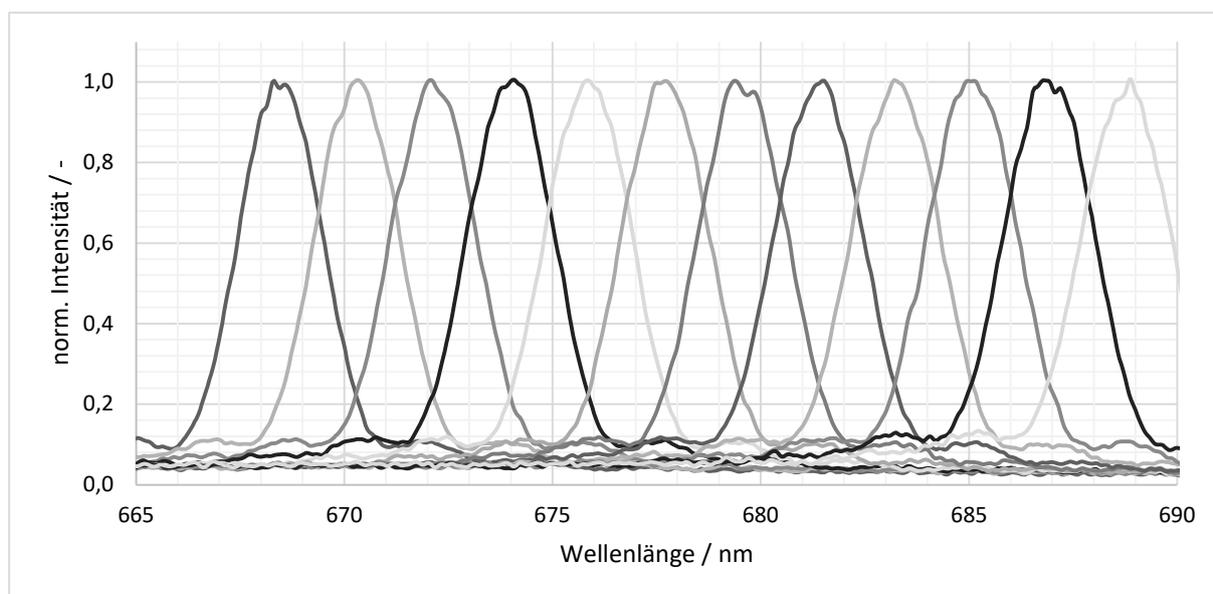


Abbildung 56: Verfahrengenauigkeit und Bandbreite des AOTFs im Bereich 665 bis 690 nm gemessen mit dem Spektrometer RXN1-532 von Kaiser Optical Systems Inc. bei einer Schrittweite von 2 nm.

Die Bandbreite der Signale zwischen 650 und 690 nm lässt sich mit 4 nm feststellen. Die zentralen Wellenlängen der Peaks weicht maximal 1 nm von der eingestellten Wellenlänge ab und haben ein gleichförmiges Erscheinungsbild. Der Bereich bis 690 nm ist laut Hersteller der effektive Arbeitsbereich des AOTFs mit der geringsten Bandbreite.¹³² Um weitere Bereiche zu validieren, wird das Kaiser-Spektrometer durch ein Tec5 Multispec ausgetauscht. Der Wellenlängenbereich ändert sich dadurch auf 800 bis 890 nm. In diesem Bereich wird in der nächsten Messreihe in 10 nm-Schritten verfahren und die Bandbreite sowie die Peakgenauigkeit ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 57 zu sehen.

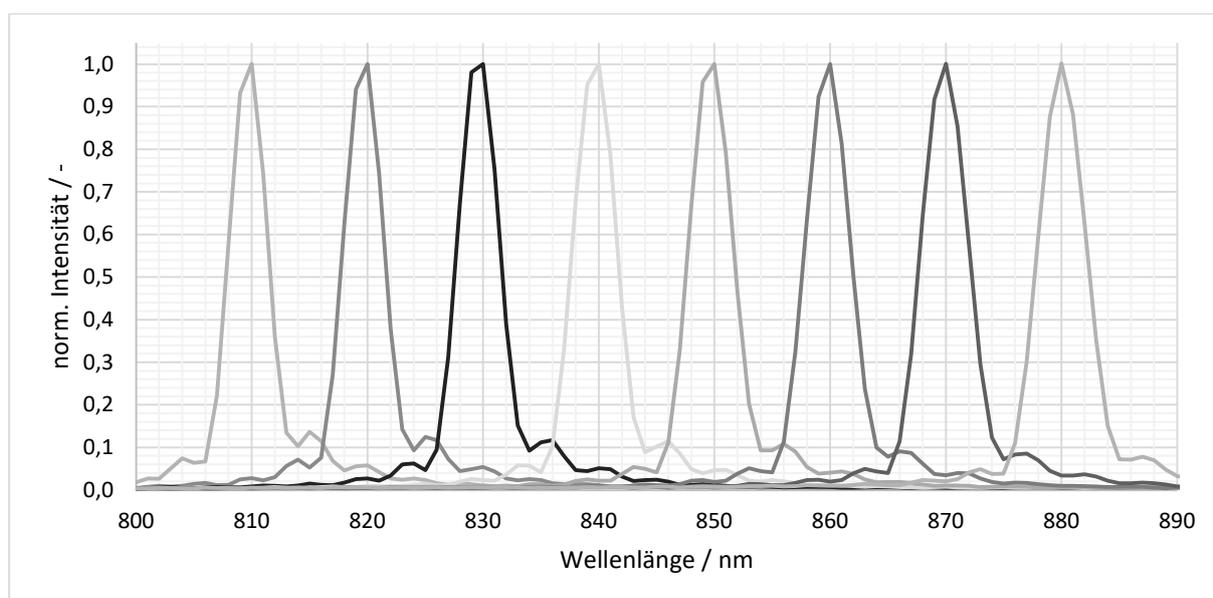


Abbildung 57: Verfahrengenauigkeit und Bandbreite des AOTFs im Bereich 800 bis 890 nm gemessen mit dem Spektrometer MultiSpec®Raman von Tec5 bei einer Schrittweite von 10 nm.

Die Bandbreite ist in diesem Bereich mit 6 nm zu beziffern. Die Peakverteilung hat eine Abweichung zwischen 0 und 1 nm und entspricht damit nahezu den Soll-Werten. Im Gegensatz zu den vorherigen Messungen im Bereich zwischen 590 und 690 nm vergrößert sich die Bandbreite um 2 nm. Die Selektivität des AOTFs wird damit in höheren Wellenlängenbereichen geringer.

Da der AOTF primär zur Darstellung von Raman-Signalen verwendet und der zugehörige Raman-Shift in Wellenzahlen mit der Einheit cm^{-1} angegeben wird, zeigt Abbildung 58 den Wellenlängenbereich zwischen 800 und 830 nm. Das bei der Messung verwendete Tec5-Raman-Spektrometer kalibriert den Raman-Shift auf den im Gerät integrierten Laser mit einer Wellenlänge von 785 nm.

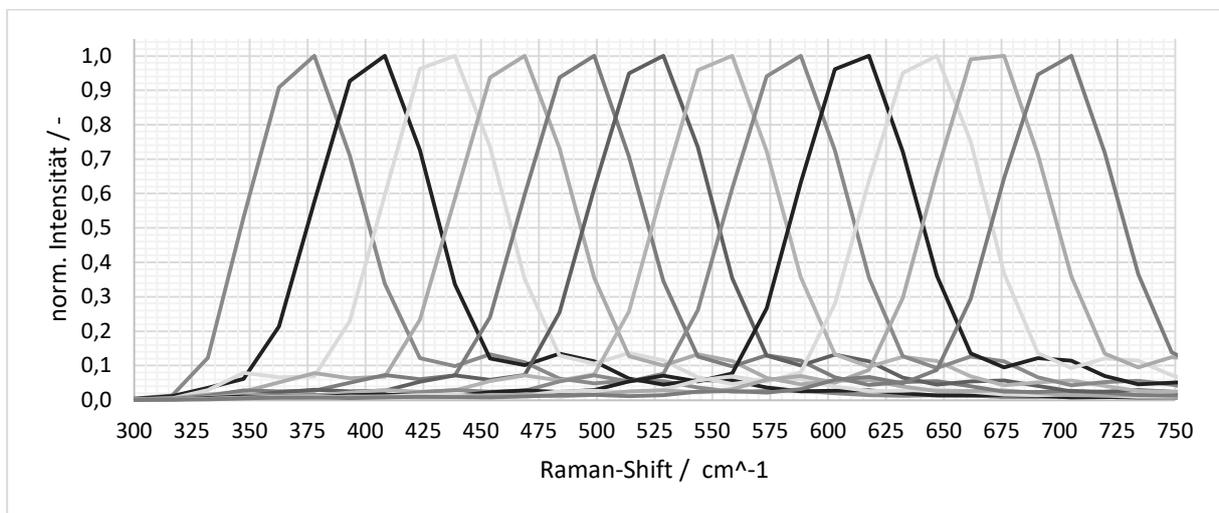


Abbildung 58: Verfahrensgenauigkeit und Bandbreite des AOTFs im Bereich 800 nm bis 830 nm bzw. 300 cm^{-1} bis 750 cm^{-1} gemessen mit dem Spektrometer MultiSpec®Raman von Tec5 bei einer Schrittweite von 2 nm.

Mit 82 cm^{-1} wird die Bandbreite der einzelnen Peaks detektiert, die über den Messbereich mit einer Abweichung von $\pm 5\text{ cm}^{-1}$ schwankt. Die zentralen Wellenlängen der Peaks weichen in einem Bereich von 20 bis 30 cm^{-1} von den eingestellten Sollwerten ab. Dies entspricht einer Abweichung von 1 nm in Wellenlängen. Wie zu erwarten war, entsprechen die Abweichung des Raman-Shifts als auch die Bandbreite des AOTFs den Messungen im nm-Bereich, da es sich lediglich um eine Transformation der Einheiten handelt. Auch hier gilt, dass die Abweichungen durch die niedrige Schrittweite geringer und die Soll-Einstellungen des AOTF präziser sind.

Für die Bestimmung der Wiederholgenauigkeit des AOTFs wird eine Wellenlänge von 699 nm eingestellt, um real eine Messung bei 700 nm zu realisieren. Die Spektraldaten werden mit dem Kaiser-Spektrometer erfasst. Nach der Messung erfolgt eine Umstellung des AOTFs auf 800 nm und zurück auf 699 bzw. 700 nm. Eine erneute Messung protokolliert das Ergebnis. Insgesamt wird dieser Prozess 10mal wiederholt. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 59 dargestellt.

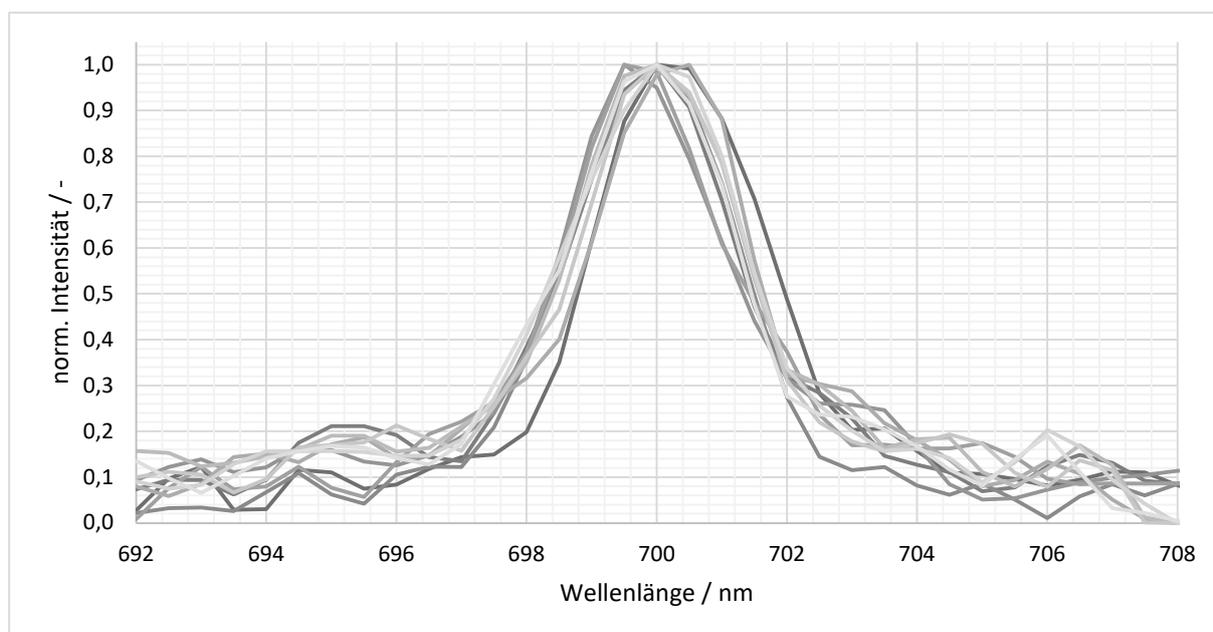


Abbildung 59: Wiederholgenauigkeitsmessungen des AOTF anhand einer spezifischen Wellenlänge von 700 nm. Die Bandbreite beträgt 4 nm. Gemessen mit dem RXN1-532 von Kaiser.

Resultierend aus den Messungen lässt sich sagen, dass der AOTF eine sehr hohe Wiederholgenauigkeit besitzt. Die Abweichung beläuft sich auf 1 nm bei einer stabilen Bandbreite von 4 nm.

Anhand der Messergebnisse lässt sich resultierend sagen, dass der AOTF ein stabiler durchstimmbarer Bandpassfilter ist, der unter Berücksichtigung der spezifischen Abweichungen in den einzelnen Wellenlängenbereichen zuverlässig die gewünschten Bereiche selektiert. Jedoch ist darauf zu achten, dass der zu messende Peak der Raman-Schwingung die zentrale Wellenlänge des AOTFs ist, da aufgrund der leichten Abweichungen die Soll-Wellenlänge nicht getroffen wird. Aufgrund der Bandbreite von 3 bis 4 nm kann eine leichte Verschiebung der Soll-Wellenlänge von durchschnittlich 2 nm ausgeglichen werden. Die geringe Bandbreite ermöglicht zudem eine Isolation einzelner Raman-Banden. Zu beachten ist jedoch, dass die Bandbreite ab einer Wellenlänge von ca. 820 nm stetig größer wird. Daher sind Messungen in höherwelligen Bereichen zu vermeiden.

3.1.8 Bildfeldbestimmung und Auflösung der Kamera

Zur Bestimmung der Dimensionen des Bildfelds sowie der Auflösung der Kamera werden monodisperse PMMA-Partikel mit einem Durchmesser von 100 μm (PMMA-F-100, micro particels GmbH, Deutschland) in ein Gel bestehend aus 2% Agarose eingebettet. Die präparierte Probe wird auf einem Probenhalter gegossen, anschließend in der Probenkammer platziert und mit Laser 2 (660 nm) bei 1 mW über eine Integrationszeit von 100 ms beleuchtet.¹²⁷ Insgesamt werden 10 Partikel vermessen. Abbildung 60 zeigt exemplarisch ein zentral positioniertes Partikel. Für die Bestimmung beider Parameter werden die Pixel am

größten Durchmesser des Partikels gezählt und auf die vorhandenen Pixel umgerechnet. Die eingezeichneten Felder entsprechen dem Durchmesser und dienen der Veranschaulichung des Bildfeldes.¹²⁷

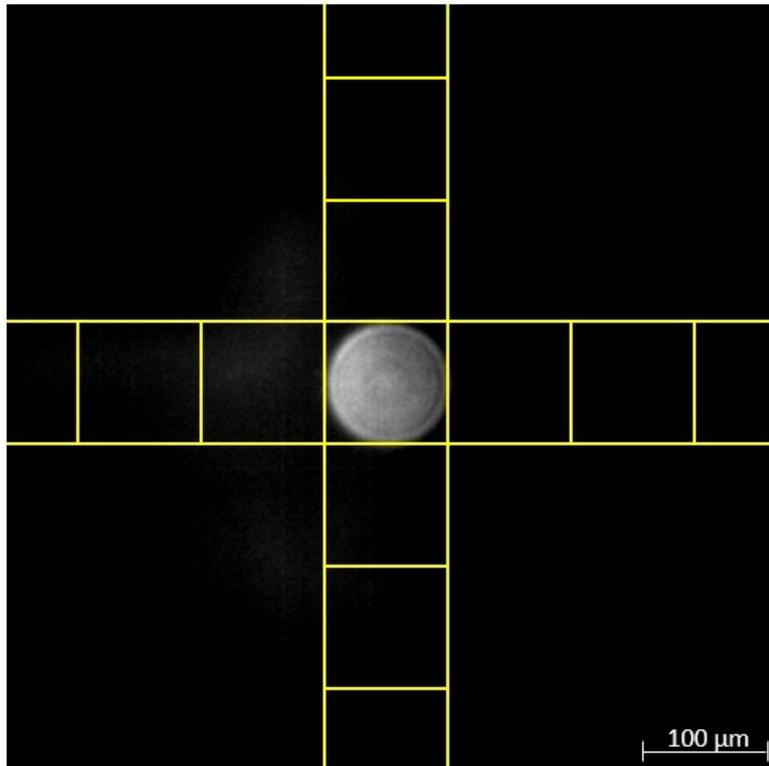


Abbildung 60: Bildfeldbestimmung der Kamera anhand eines 100 μm PMMA-Partikels. Die gelben Bereiche entsprechen dem Durchmesser eines Partikels und dienen der Veranschaulichung der Bildfelddimensionen.¹²⁷

Eine grobe Abschätzung der tatsächlichen Bildbreite lässt sich anhand der eingezeichneten Quadrate vornehmen. So wird das Bildfeld mit 6,4 Quadraten gemessen und ergibt eine Breite von 640 μm. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Pixelanzahl gemessen am Durchmesser der einzelnen Partikel zur Bestimmung des Bildfelds.

Aufnahme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pixelanzahl	157	167	161	165	157	159	161	170	154	157
Resultierender Durchschnitt: 160,9										

Anhand des Durchschnittswerts der Pixelbreite der Partikel errechnet sich die tatsächliche Breite des Bildfeldes x bezogen auf die Pixelbreite des Kamerachips von 1024 x 1024 Pixel wie folgt:

$$\frac{1024 \text{ Pixel}}{160,9 \text{ Pixel}} = \frac{x}{100 \mu\text{m}} \quad (24)$$

$$\rightarrow x = \frac{1024 \text{ Pixel}}{160,9 \text{ Pixel}} \cdot 100 \mu\text{m} = 636,42 \mu\text{m} \approx 640 \mu\text{m}$$

Das geschätzte Bildfeld entspricht bis auf 3,58 μm genau dem realen Bildfeld. Da die Kamera aufgrund des Binnings eine um den Faktor 4 reduzierte Auflösung von 1024 x 1024 Pixel besitzt, besteht die Möglichkeit, das Bildfeld zu vergrößern. Die zu vermessenden Sphäroide besitzen jedoch einen maximalen Durchmesser von 500 μm . Daher ist das Bildfeld der Kamera ausreichend, um einen vollständigen Lichtschnitt der Proben aufzunehmen.

Die Berechnung der Auflösung erfolgt über die Pixelanzahl bezogen auf die Abmessung des Bildfelds.

$$\frac{1024 \text{ Pixel}}{636,42 \mu\text{m}} = 1,61 \frac{\text{Pixel}}{\mu\text{m}} \quad (25)$$

Im Umkehrschluss bedeutet dies für die Auflösung in μm pro Pixel:

$$\frac{636,42 \mu\text{m}}{1024 \text{ Pixel}} = 0,622 \frac{\mu\text{m}}{\text{Pixel}} \quad (26)$$

Als Resultat gilt festzuhalten, dass das Bildfeld der Kamera mit den Abmessungen von 640 x 640 μm und die berechnete Auflösung von 0,622 μm pro Pixel den Anforderungen der Proben entsprechen und Dimensionen einzelner Strukturen innerhalb der Proben darstellbar und messbar sind. Theoretisch betrachtet besitzt die Kamera die Möglichkeit, eine um den Faktor 4 verbesserte Auflösung zu erzeugen. Da dies jedoch nur mit einer Reduzierung der Empfindlichkeit und des SNR einher geht und die gemessenen Parameter ausreichend für den Betrieb des LSRM sind, entspricht die Kamera den Vorgaben zum Einsatz im LSRM.

3.1.9 Pixel-Stabilität

Zur Bestimmung der relativen Ungenauigkeit der einzelnen Pixel auf dem Kamera-Chip wird eine Aufnahme einer Ebene von einem HT29-Fibroblasten-Sphäroid durchgeführt. Die verwendeten Einstellungen sind Rayleigh und Raman.

Für die Rayleigh-Einstellung wird Laser 2 mit einer Wellenlänge von 660 nm und einer Leistung von 1 mW verwendet. Die Belichtungszeit beträgt 100 ms und der AOTF ist auf 660 nm eingestellt. Die Durchführung der Raman-Messungen erfolgt ebenfalls mit Laser 2 mit einer Wellenlänge von 660 nm. Die Leistung wird auf 130 mW und die Integrationszeit 5000 ms eingestellt. Der AOTF lässt eine Wellenlänge von 817 nm passieren. Dies entspricht einer Wellenzahl von 2900 cm^{-1} . Jeweils 10 Bildaufnahmen desselben Schnitts dienen als Grundlage für die Analyse. In Abbildung 61 ist ein ausgewählter Bildausschnitt mit einem HT29-Fibroblasten-Sphäroid dargestellt. Innerhalb der hervorgehobenen Bereiche werden jeweils 9 Pixel ausgewählt und vergrößert. Durch eine Umrechnung werden die Graubereiche

der Pixel von den vorgegebenen 16 Bit auf 8 Bit-Werte transformiert. Dabei wird die maximale Pixelintensität von 65535 auf 255 reduziert. Dieses Vorgehen ermöglicht die Untersuchung der relativen Ungenauigkeit der einzelnen Pixel auf dem Kamera-Chip und trägt zur Charakterisierung der Bildqualität und -genauigkeit bei. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Einstellungen wie Rayleigh und Raman können spezifische Aspekte des Bildaufnahmeprozesses analysiert werden. Die durchgeführten Aufnahmen und Auswertungen dienen der weiteren Optimierung und Verfeinerung der bildgebenden Techniken.

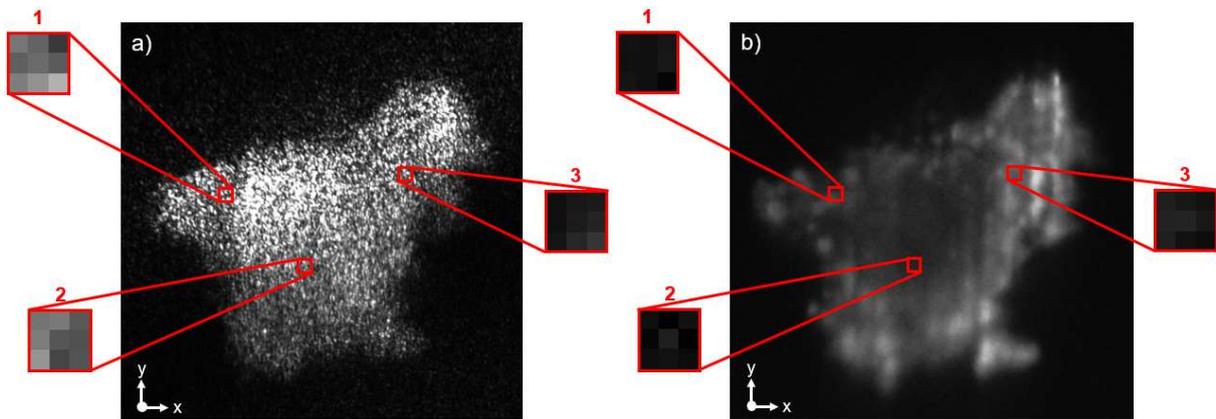


Abbildung 61: Bildausschnitt eines HT29-Fibroblasten-Sphäroids zur Bestimmung der relativen Ungenauigkeit des Kamerachips bei unterschiedlichen Modalitäten des LSM a) Rayleigh und b) Raman. Die rot markierten Bereiche zeigen die Graustufen der untersuchten Pixel an. Das Bild wurde für eine bessere Sichtbarkeit der untersuchten Bereiche zugeschnitten.

Die vergrößerten Darstellungen der spezifischen Bereiche der Rayleigh-Messung in a) zeigen deutliche Unterschiede in den Pixelwerten von Bereich 1 und 2, die durch unterschiedliche Graustufen erkennbar sind. Im Gegensatz dazu weist Bereich 3 eine gleichmäßige Verteilung der Graustufen auf. Dies deutet darauf hin, dass in Bereich 1 und 2 signifikante Unterschiede in der Intensität des gemessenen Lichts vorliegen, während Bereich 3 eine relativ konstante Intensität aufweist. Für die Bestimmung der relativen Abweichung der einzelnen Pixel in Bezug auf die Kameraauflösung werden die Messwerte der einzelnen Punkte als 16-Bit-Werte verglichen und ein Mittelwert gebildet, der als Grundlage für die Berechnung dient. Dieser Ansatz ermöglicht es, die durchschnittliche Abweichung der Pixelwerte in den jeweiligen Bereichen zu ermitteln. In Abbildung 62 werden die Ergebnisse der einzelnen Pixel für Bereich 1 der Rayleigh-Messung dargestellt. Die blaue Linie repräsentiert die gemessenen Pixelwerte über 10 Messungen. Basierend auf diesen zehn Messdaten wird die rote Linie als berechneter Mittelwert dargestellt. Diese Darstellung ermöglicht eine bessere Einschätzung der Variation der Pixelwerte innerhalb von Bereich 1. Durch die Analyse der Pixelwerte und die Berechnung des Mittelwerts erhalten wir wertvolle Informationen über die Konsistenz und Genauigkeit der Messergebnisse in den verschiedenen Bereichen. Diese Daten tragen zur Beurteilung der

Qualität und Verlässlichkeit der Messungen bei und helfen bei der weiteren Optimierung der Messmethoden und -einstellungen.

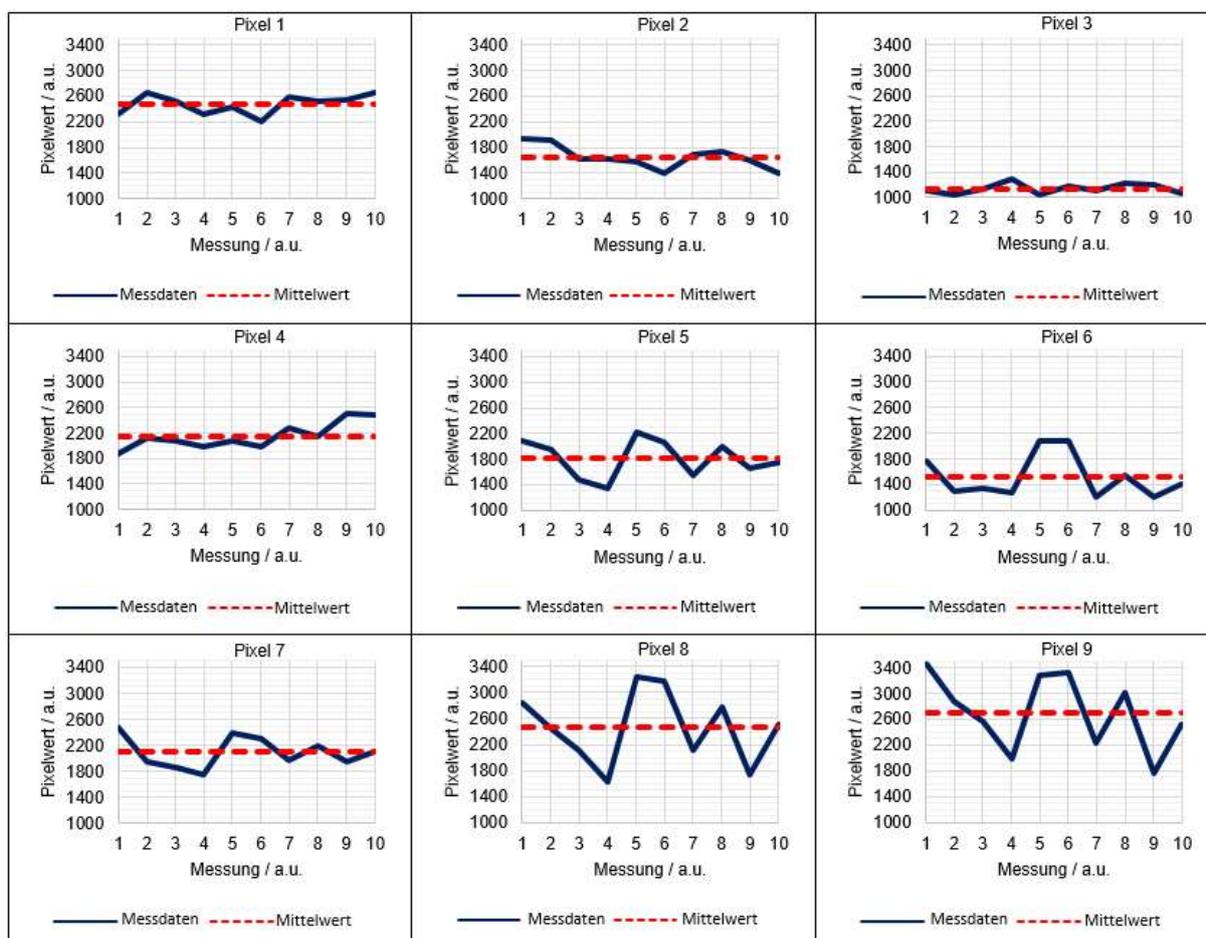


Abbildung 62: Ermittelte Messdaten, dargestellt durch die blaue Linie, der einzelnen Pixel in Bereich 1 der Rayleigh-Messung. Die rote Linie gibt den berechneten Mittelwert an. Die Anordnung der Felder entspricht der Anordnung der Pixel in den entsprechenden Bereichen von Bild a) in Abbildung 61.

Bei der Analyse der Pixel in Bereich 1 lässt sich feststellen, dass es bei den verschiedenen Pixeln auf dem Kamerachip unterschiedlich starke Schwankungen gibt. Der gemessene Wertebereich liegt durchschnittlich zwischen 1140 (Pixel 3) und 2700 (Pixel 9). Während die Werte bei Pixel 1, 3 und 4 nur geringfügig variieren und eine geringe Schwankung aufweisen, zeigen Pixel 8 und 9 teilweise Unterschiede von bis zu 1600 zwischen aufeinanderfolgenden Messungen. Die Auswertung der Messergebnisse in Bereich 1 ergibt eine deutliche Spannweite an relativen Abweichungen der Pixelwerte. Die Pixel zeigen Abweichungen von 18,34 % (mit einem Bereich von -10,86 % bis 7,48 %) bei Pixel 1 bis hin zu 66,31 % (mit einem Bereich von -21,10 % bis 37,59 %) bei Pixel 6. Dies verdeutlicht, dass die gemessenen Werte innerhalb dieses Bereichs eine erhebliche Variation aufweisen. Bei genauer Betrachtung der einzelnen Messungen fällt auf, dass Messung 10 von Pixel 7 die geringste relative Abweichung mit nur 0,73 % aufweist. Dies zeigt, dass die Messwerte in dieser spezifischen Messung von Pixel 7 sehr nahe am Mittelwert liegen und eine hohe Genauigkeit aufweisen.

Im Gegensatz dazu weist Messung 6 von Pixel 6 die höchste relative Abweichung mit 37,59 % auf. Dies bedeutet, dass die gemessenen Werte in dieser spezifischen Messung von Pixel 6 deutlich vom errechneten Mittelwert abweichen und eine beträchtliche Variation aufweisen. Um die Streuung der Messwerte in Bereich 1 besser zu veranschaulichen, wird die Standardabweichung in Abbildung 63 dargestellt.

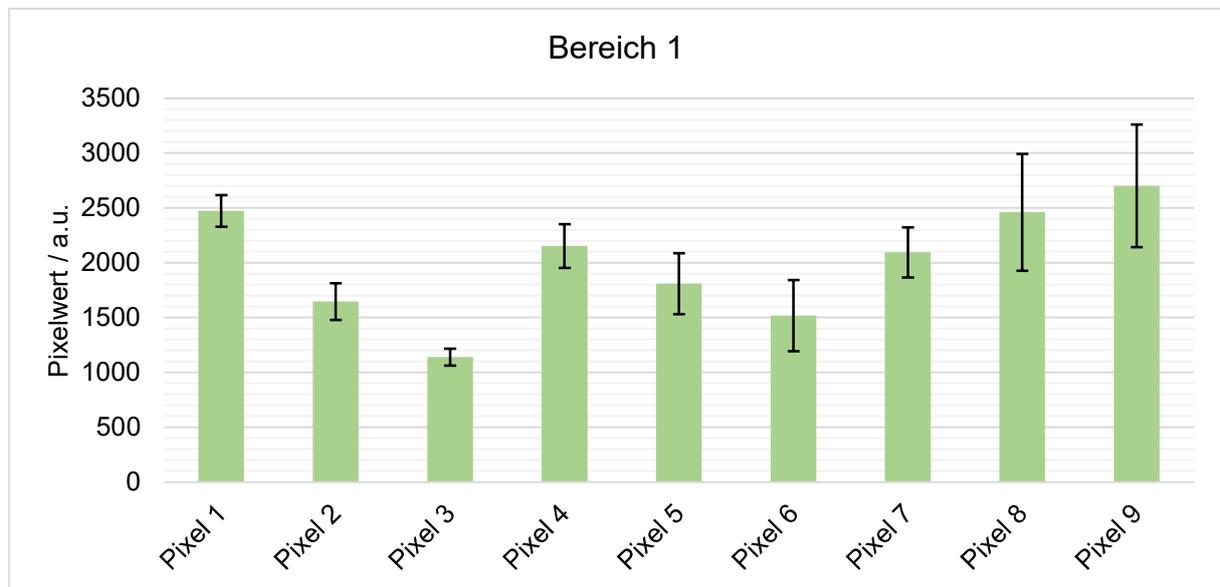


Abbildung 63: Standardabweichung der einzelnen Pixel von Bereich 1 der Rayleigh-Messung.

Bei genauer Betrachtung der vorliegenden Grafik wird deutlich, dass Pixel 3 im Vergleich zu den anderen betrachteten Pixeln die geringste Standardabweichung aufweist. Diese geringe Standardabweichung deutet darauf hin, dass die Messwerte dieses Pixels stabil sind und nur geringe Variationen aufweisen. Das bedeutet, dass die erfassten Werte in Bereich 1 für Pixel 3 im Allgemeinen konsistent sind. Dies ist ein positives Ergebnis, da es auf eine hohe Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Messungen hinweist. Auf der anderen Seite zeigen Pixel 8 mit ± 532 und Pixel 9 mit ± 560 eine deutlich höhere Standardabweichung im Vergleich zu den anderen Pixeln. Dies deutet darauf hin, dass die Werte dieser beiden Pixel stärker schwanken und eine größere Bandbreite an Variation aufweisen. Es ist zu bemerken, dass die Messungen für Pixel 8 und 9 scheinbar eine erhöhte Anzahl von Unregelmäßigkeiten und Schwankungen aufweisen im Vergleich zu den anderen Pixel. Dies könnte auf bestimmte Einflussfaktoren oder Störungen hinweisen, die die Messergebnisse in diesem Bereich beeinflussen.

Die Messergebnisse von Bereich 2 sind in Abbildung 64 zu sehen. Ähnlich wie in Bereich 1 ist auch hier die Intensitätsverteilung innerhalb dieses Bereichs stark variierend, was sich durch helle und dunkle Pixel darstellt. Dies deutet darauf hin, dass es in diesem Bereich eine größere Variation der gemessenen Intensität gibt. Die Ursachen für diese Variation können verschiedene Faktoren wie Streuungseffekte oder Hintergrundrauschen sein.

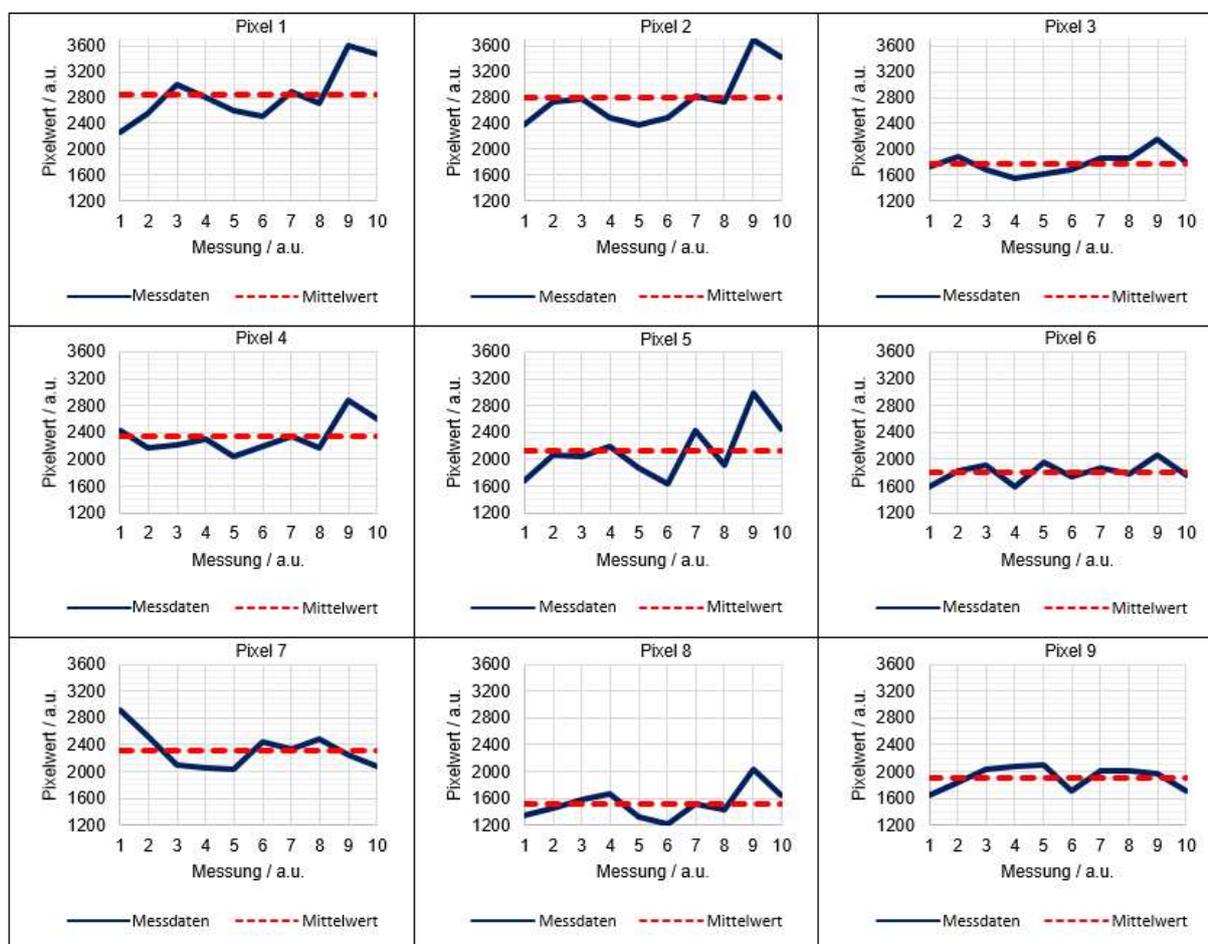


Abbildung 64: Ermittelte Messdaten, dargestellt durch die blaue Linie, der einzelnen Pixel in Bereich 2 der Rayleigh-Messung. Die rote Linie gibt den berechneten Mittelwert an. Die Anordnung der Felder entspricht der Anordnung der Pixel in den entsprechenden Bereichen von Bild a) in Abbildung 61.

Die Schwankungen in Bereich 2 variieren zwischen 20 (Pixel 3) und 890 (Pixel 1). Es ist jedoch erkennbar, dass vermehrt Abweichungen bei der neunten Messung in jedem Pixel auftreten, außer in Pixel 7 und 9, wo keine Abweichung festgestellt wurde.

Die Analyse der Messergebnisse in Bereich 2 zeigt eine Variation der relativen Abweichungen bei den einzelnen Pixeln. Die Abweichungen reichen von -23,30 % (Messung 6 bei Pixel 5) bis zu +40,88 % (Messung 9 bei Pixel 5). Die Bandbreite der Abweichungen erstreckt sich von 23,95 % (Pixel 9) bis zu 64,18 % (Pixel 5). Besonders interessant ist, dass die neunte Messung bei den meisten Pixeln (außer Pixel 7 und 9) die höchste relative Abweichung aufweist. Dies deutet darauf hin, dass in dieser spezifischen Messung bei den meisten Pixeln die größten Abweichungen von den erwarteten Werten auftreten. Insbesondere bei Pixel 5 und Pixel 8 sind die Abweichungen bei der neunten Messung mit 40,88 % bzw. 33,79 % am höchsten.

Im Vergleich zu den Pixeln in Bereich 1 zeigt sich, dass diese erhöhten Abweichungen ausschließlich in Bereich 2 auftreten. Dies schließt eine Veränderung der äußeren Messbedingungen als Ursache aus. Es ist anzumerken, dass möglicherweise spezifische Eigenschaften oder Besonderheiten in diesem Bereich zu den erhöhten Abweichungen führen.

Um die Streuung der Messwerte in Bereich 2 zu veranschaulichen, wird die Standardabweichung in Abbildung 65 dargestellt

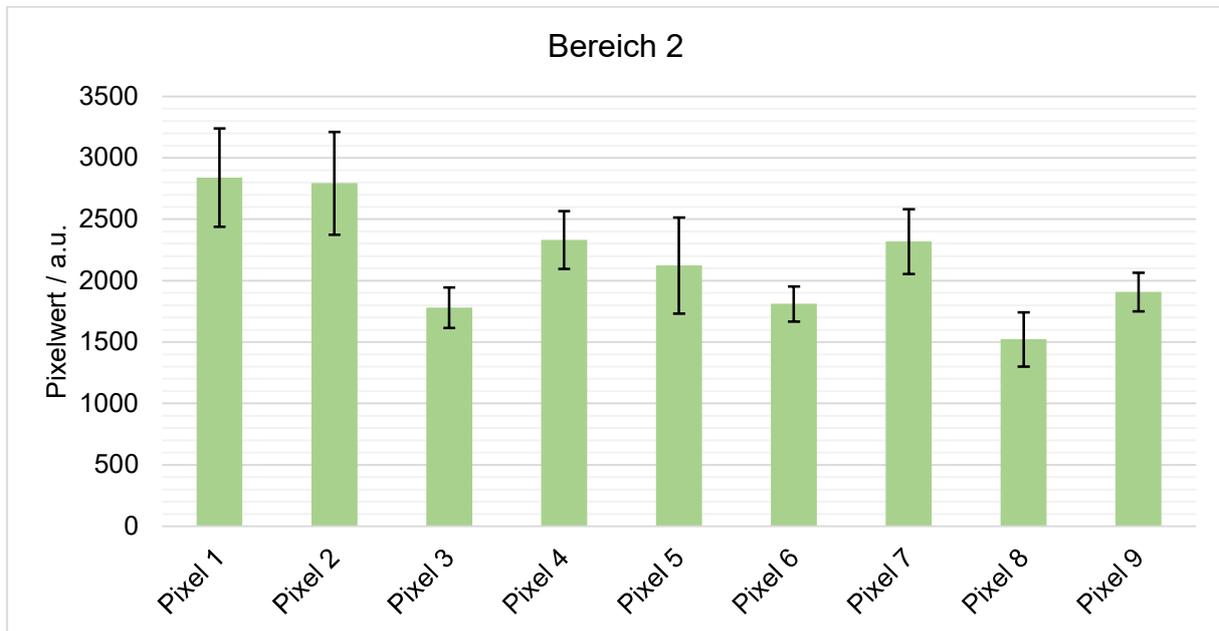


Abbildung 65: Standardabweichung der einzelnen Pixel von Bereich 2 der Rayleigh-Messung.

Die vorliegende Grafik liefert wichtige Informationen über die Standardabweichungen der einzelnen Pixel in Bereich 2. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass Pixel 3, 6 und 9 die geringste Standardabweichung aufweisen. Dies bedeutet, dass die Messwerte bei diesen Pixeln im Vergleich zu den anderen Pixeln in Bereich 2 relativ stabil und konsistent sind. Es gibt nur eine geringe Streuung der Messwerte um den Durchschnitt. Im Gegensatz dazu zeigen Pixel 1 (± 401), 2 (± 417) und 5 (± 390) die größte Standardabweichung, was auf eine größere Variation der Messwerte hinweist. Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Pixeln eine größere Bandbreite an Messwerten vorliegt und die Messungen weniger konsistent sind. Es kann verschiedene Gründe für diese erhöhte Variation geben, wie zum Beispiel mögliche Störungen oder Einflüsse, die spezifisch auf diese Pixel wirken. Interessanterweise zeigen Pixel 8 und 9 in Bereich 2 keine größeren Unregelmäßigkeiten im Vergleich zu den anderen Pixeln. Dies bedeutet, dass die Messwerte bei diesen Pixeln relativ stabil sind und eine geringere Variation aufweisen. Es ist möglich, dass bestimmte Merkmale oder Eigenschaften dieser Pixel zu einer erhöhten Stabilität führen und mögliche externe Einflüsse besser kompensieren können.

In Abbildung 66 sind die Messergebnisse von Bereich 3 zu sehen. Im Vergleich zu Bereich 1 und 2 ist die Beleuchtung der Pixel in Bereich 3 niedrig, was sich durch das schwarze Erscheinungsbild innerhalb des roten Rahmens in Abbildung 61 äußert.

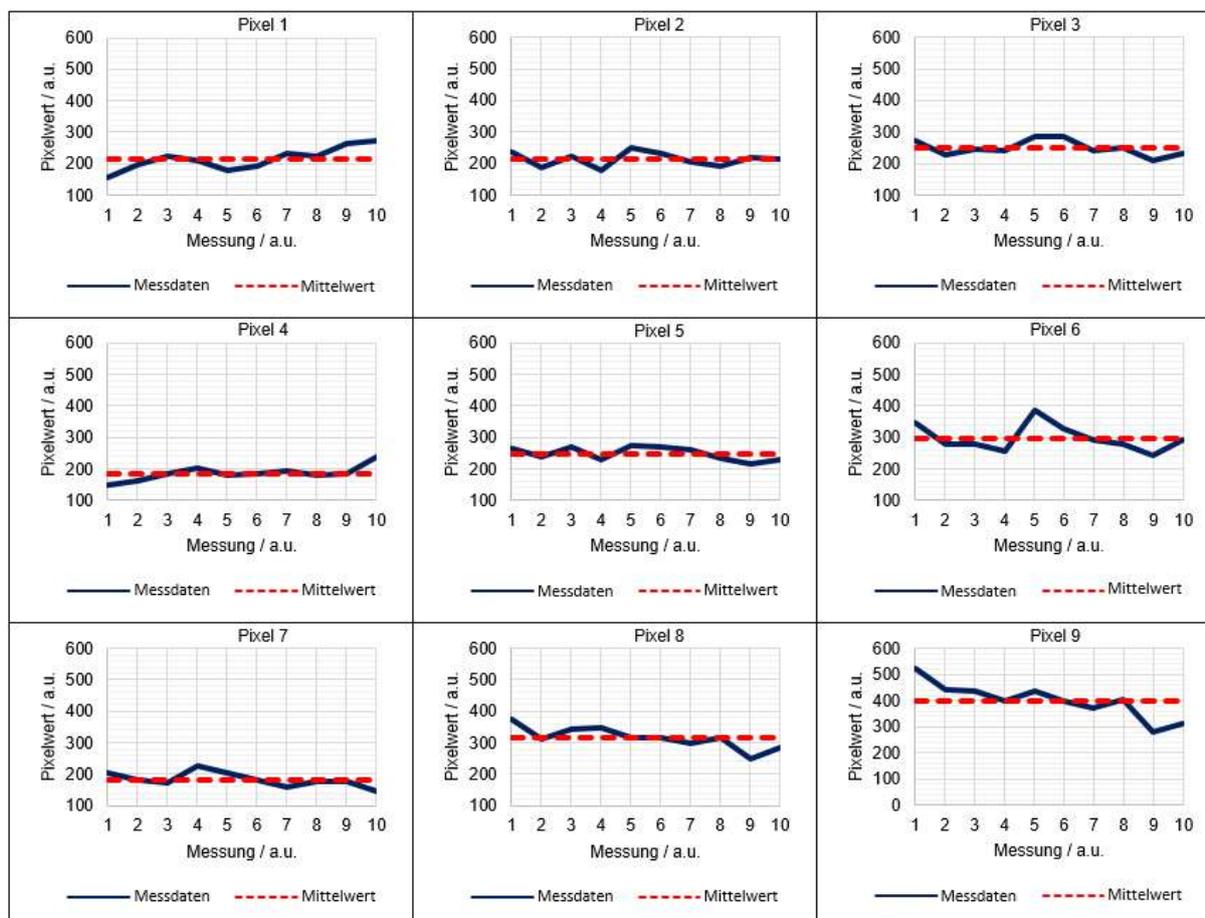


Abbildung 66: Ermittelte Messdaten, dargestellt durch die blaue Linie, der einzelnen Pixel in Bereich 3 der Rayleigh-Messung. Die rote Linie gibt den berechneten Mittelwert an. Die Anordnung der Felder entspricht der Anordnung der Pixel in den entsprechenden Bereichen von Bild a) in Abbildung 61.

Die berechneten Mittelwerte für Bereich 3 sind geringer als die Durchschnittswerte von Bereich 1 und 2. Dies deutet darauf hin, dass der Bildausschnitt insgesamt dunkler ist als die beiden zuvor gezeigten Bereiche. Mit einem Maximalwert von 400 bei Pixel 9 ist die Beleuchtung im Vergleich zum niedrigsten Durchschnittswert von Bereich 1 (1150 bei Pixel 3) und Bereich 2 (1520 bei Pixel 8) um den Faktor 2,86 bzw. 3,8 geringer. Der Verlauf der Messungen zeigt jedoch eine gleichmäßigere Verteilung der Messwert. Die in Bereich 2 festgestellte Erhöhung der Werte in der neunten Messung ist in Bereich 3 nicht vorhanden. Die Auswertung der Messergebnisse in Bereich 3 zeigt, dass die relative Abweichung der einzelnen Pixel in einem ähnlichen Bereich liegt wie in den vorherigen Bereichen. Die Spanne der Abweichungen reicht von 0,02 % (bei Messung 4 von Pixel 9) bis zu 29,31 % (bei Messung 10 von Pixel 4). Dies bedeutet, dass es trotz gewisser Variationen insgesamt eine relativ gute Übereinstimmung der Messwerte mit den errechneten Mittelwerten gibt. Die geringste Spanne der relativen Abweichungen liegt bei 22,91 % (bei Pixel 5), während die größte Spanne bei 60,37 % (bei Pixel 9) liegt. Dies zeigt, dass einige Pixel in Bereich 3 eine größere Variation in den Messwerten aufweisen als andere. Es ist möglich, dass bestimmte Faktoren oder Merkmale der Pixel zu dieser erhöhten Variation beitragen. Die festgestellten relativen Abweichungen in

Bereich 3 befinden sich in einer ähnlichen Größenordnung wie in den vorherigen Bereichen. Dies deutet darauf hin, dass die Messungen in diesem Bereich insgesamt vergleichbar mit den Messungen in den anderen Bereichen sind. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Variation in den Messwerten in diesem Bereich ähnliche Ursachen wie in den vorherigen Bereichen hat. Es ist wichtig anzumerken, dass die relativen Abweichungen bei der Interpretation der Messergebnisse berücksichtigt werden sollten, um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu bewerten.

Die Standardabweichungen der Messungen in Bereich 3 sind in Abbildung 67 dargestellt.

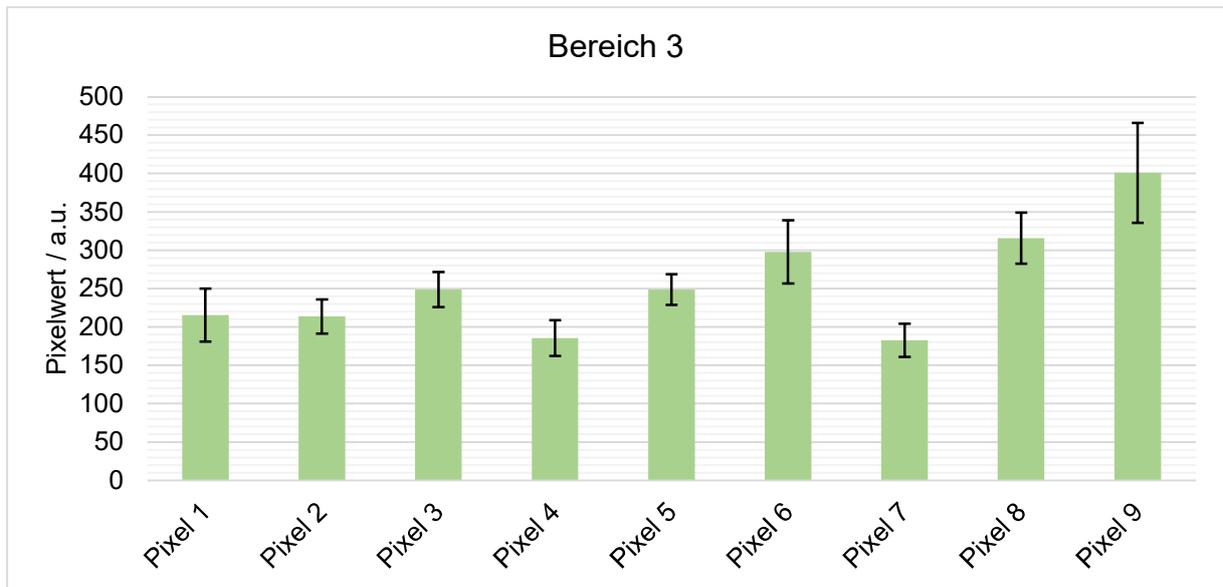


Abbildung 67: Standardabweichung der einzelnen Pixel von Bereich 3 der Rayleigh-Messung.

Bei der Analyse der Standardabweichungen fällt auf, dass die Abweichungen der einzelnen Pixel in Bereich 3 relativ gleichmäßig verteilt sind. Es gibt jedoch ein Pixel, Pixel 9, das sich deutlich von den anderen Pixeln abhebt und eine signifikant höhere Abweichung aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass bei diesem Pixel eine größere Variation der Messwerte vorliegt als bei den anderen Pixeln in Bereich 3. Die maximale Abweichung beträgt $\pm 65,1$ bei Pixel 9. Die Mittelwerte der Abweichungen in Bereich 3 sind im Vergleich zu den Werten in den Bereichen 1 und 2 um den Faktor 10 niedriger. Dies deutet darauf hin, dass die Messwerte in Bereich 3 im Durchschnitt genauer und weniger variabel sind als in den anderen Bereichen. Dies könnte auf spezifische Eigenschaften oder Merkmale der Pixel in diesem Bereich zurückzuführen sein. Die niedrigste Abweichung wird bei Pixel 2 und 5 festgestellt, was darauf hinweist, dass die Messwerte dieser Pixel im Vergleich zu den anderen Pixeln in Bereich 3 relativ stabil und präzise sind. Dies kann darauf hindeuten, dass diese Pixel bestimmte Eigenschaften aufweisen, die zu einer geringeren Variation der Messwerte führen.

Bei einer umfassenden Auswertung sämtlicher Messergebnisse für die Rayleigh-Konfiguration des LSRM ergibt sich, dass die Abweichungen auf dem Kamerachip einen Bereich von 0,02

% bis 40,88 % abdecken. Diese relativ große Spannweite der Abweichungen hat zur Folge, dass einzelne Bilder innerhalb einer Aufnahmeserie deutlich voneinander abweichen können. Diese Variationen können wiederum Einfluss auf die Zuverlässigkeit der Messergebnisse nehmen. Es ist jedoch interessant festzustellen, dass keine direkte Korrelation zwischen den festgestellten Abweichungen und der Helligkeit der Pixelwerte besteht. Dies deutet darauf hin, dass andere Faktoren als die Helligkeit die Abweichungen beeinflussen könnten. Die nachstehenden Messungen für die Raman-Einstellungen (Bereich b) in Abbildung 61) werden analog zu den Messungen im Rayleigh-Bereich durchgeführt. In Abbildung 68 sind die Ergebnisse für den ersten Bereich der Raman-Messungen dargestellt.

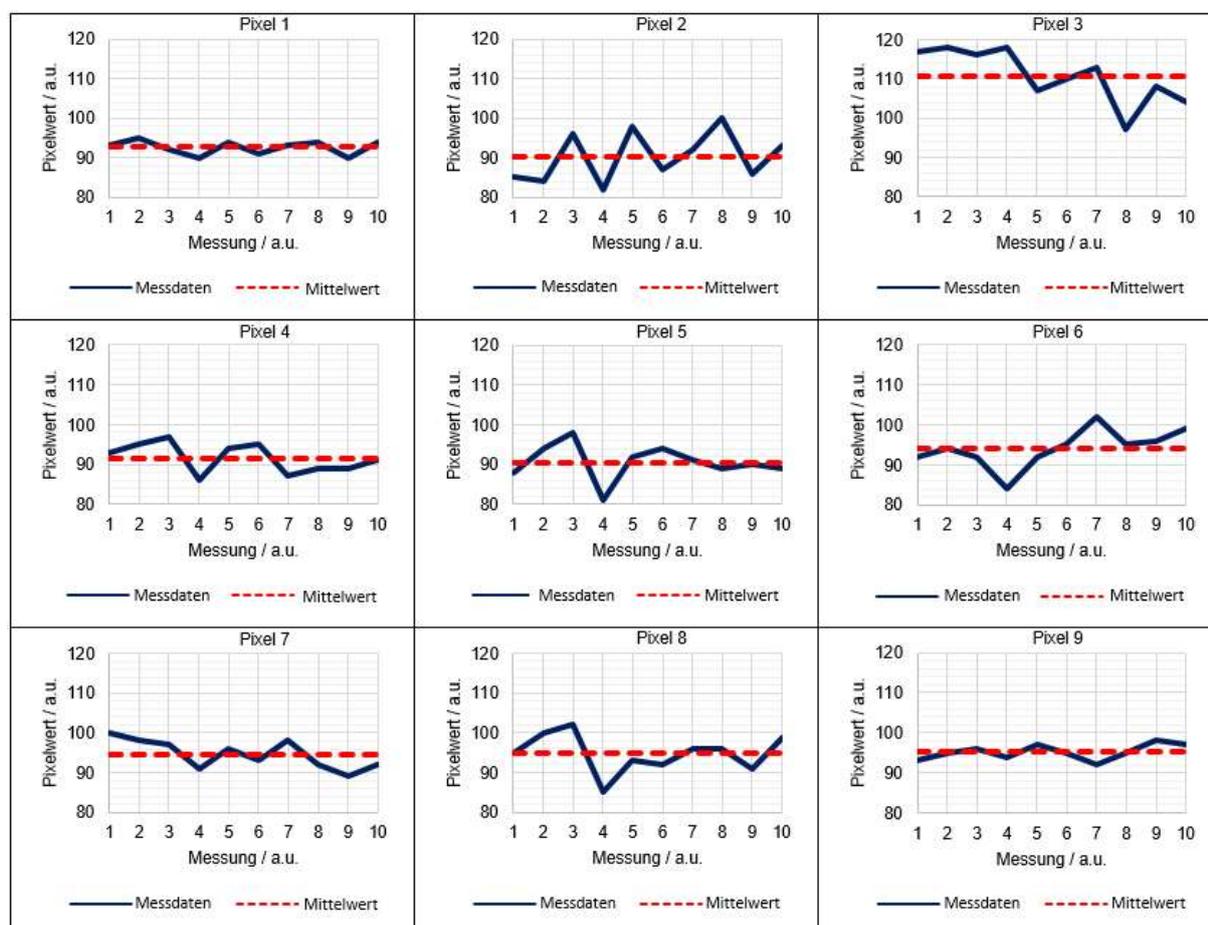


Abbildung 68: Ermittelte Messdaten, dargestellt durch die blaue Linie, der einzelnen Pixel in Bereich 1 der Raman-Messung. Die rote Linie gibt den berechneten Mittelwert an. Die Anordnung der Felder entspricht der Anordnung der Pixel in den entsprechenden Bereichen von Bild b) in Abbildung 61.

Die ermittelten Durchschnittswerte der Intensität für die Raman-Einstellungen liegen im Bereich von 95, was im Vergleich zu den vorherigen Messungen im Rayleigh-Modus einen deutlich geringeren Wert darstellt. Es fällt auf, dass diese Raman-Messungen insgesamt eine geringere Variation aufweisen. Die geringste Abweichung von 1 findet sich in der ersten Messung des ersten Pixels, während die größte Abweichung von 13 in der achten Messung des dritten Pixels auftritt. Auffällig ist jedoch die vierte Messung, die sich signifikant von der

vorherigen dritten Messung unterscheidet. Hier ist ein allgemeiner Rückgang der Pixelintensität bei allen Pixeln zu beobachten, mit Ausnahme des dritten Pixels, bei dem eine minimale Intensitätssteigerung zu erkennen ist. Diese Diskrepanz in der vierten Messung weist darauf hin, dass es andere Faktoren gibt, die sich auf die Intensität der Pixel auswirken und möglicherweise das Messergebnis beeinflussen. Die relativen Abweichungen erstrecken sich von 0,11 % (Messung 1, Pixel 8) bis hin zu -12,45 % (Messung 8, Pixel 3). Dabei ist eine beachtliche Bandbreite von 19,93 % bei Pixel 2 zu verzeichnen. Es ist anzumerken, dass negative Abweichungen auf eine verringerte Intensität hinweisen. Um den Grad der Variation innerhalb des Bereichs 1 der Raman-Messungen darzustellen, wird in Abbildung 69 die Standardabweichung veranschaulicht.

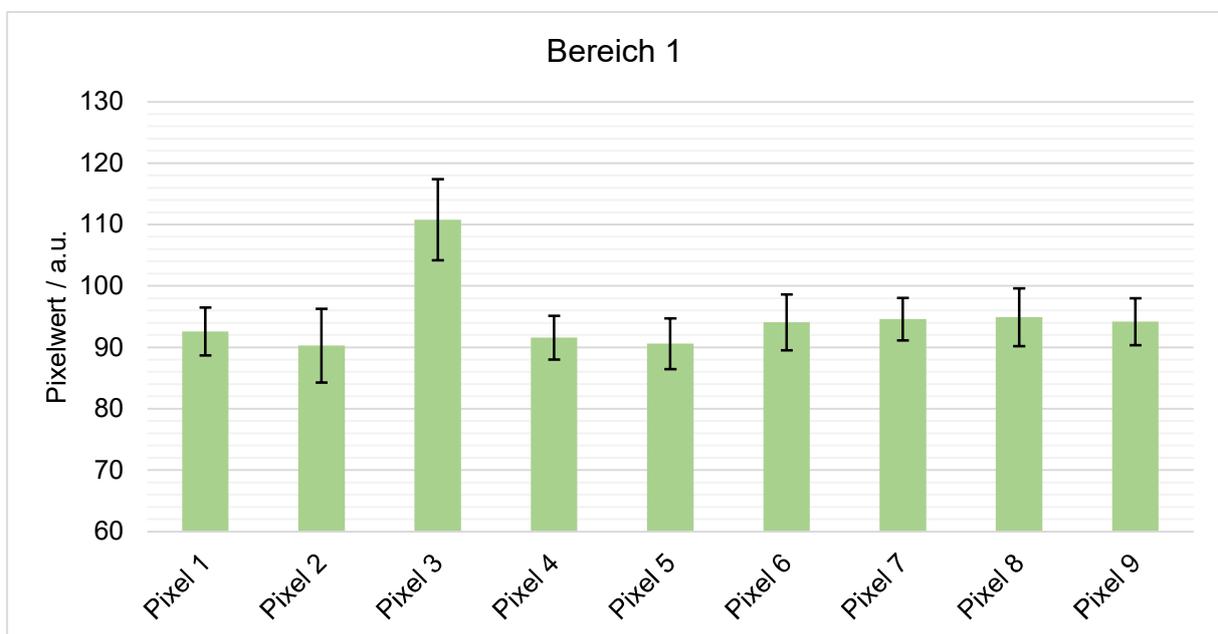


Abbildung 69: Standardabweichung der einzelnen Pixel von Bereich 1 der Raman-Messung.

Die Abweichungen der Pixelwerte zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung, wobei lediglich bei Pixel 3 eine minimale Erhöhung der Abweichung festzustellen ist. Die Abweichungen betragen maximal $\pm 6,6$ bei Pixel 3. Es fällt auf, dass die Varianz der Messergebnisse bei allen Pixeln nahezu gleichmäßig verteilt zu sein scheint. Diese gleichmäßige Verteilung deutet darauf hin, dass die Messungen eine hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit aufweisen. Die Tatsache, dass keine signifikanten Ausreißer oder Muster in den Abweichungen erkennbar sind, unterstützt die Annahme einer stabilen Messperformance. Dies ist ein positives Zeichen, da eine gleichmäßige Verteilung der Abweichungen darauf hindeutet, dass die Messungen konsistent sind und unabhängig von bestimmten Pixelpositionen oder Konfigurationen des LSRM-Systems reproduzierbare Ergebnisse liefern. Um die erste Annahme weiter zu überprüfen, wird in Abbildung 70 eine Untersuchung der Pixel im Bereich 2 durchgeführt.

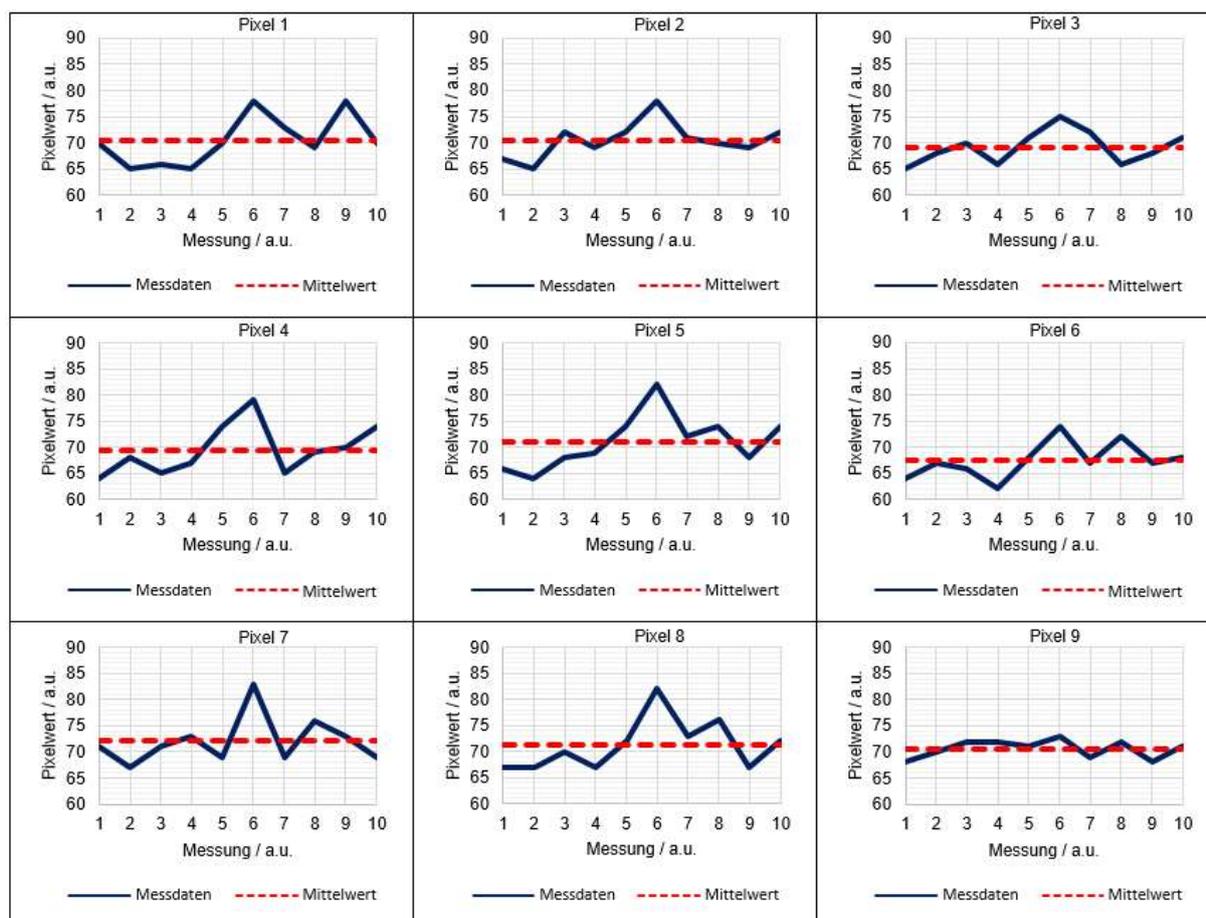


Abbildung 70: Ermittelte Messdaten, dargestellt durch die blaue Linie, der einzelnen Pixel in Bereich 2 der Raman-Messung. Die rote Linie gibt den berechneten Mittelwert an. Die Anordnung der Felder entspricht der Anordnung der Pixel in den entsprechenden Bereichen von Bild b) in Abbildung 61.

Im Bereich 2 zeigen die Intensitätswerte ähnlich wie im Bereich 1 hohe zweistellige Werte. Die Abweichungen der Pixel liegen zwischen 1 (Messung 10, Pixel 1) und 11 (Messung 6, Pixel 5 und 7). Der höchste gemessene Intensitätswert beträgt 83 (Messung 6, Pixel 7). Besonders auffällig ist, dass bei Messung 6 in jedem Pixel der Messreihe der maximale Wert auftritt. Die relativen Abweichungen variieren zwischen 15,33 % (Messung 6, Pixel 5) und 0,57 % (Messung 1, Pixel 1 und Messung 10, Pixel 9). Die größte Schwankung findet sich bei Pixel 5 mit 25,32 %, während die geringste Schwankung bei Pixel 9 mit 7,08 % festgestellt wird. Die Untersuchung der Standardabweichung in Abbildung 71 für Bereich 2 vermittelt einen Eindruck von der Streuung der Messwerte. Dadurch lässt sich erkennen, wie stark die Daten innerhalb des Bereichs variieren und ob es möglicherweise Ausreißer oder spezielle Muster gibt, die weiter untersucht werden müssen.

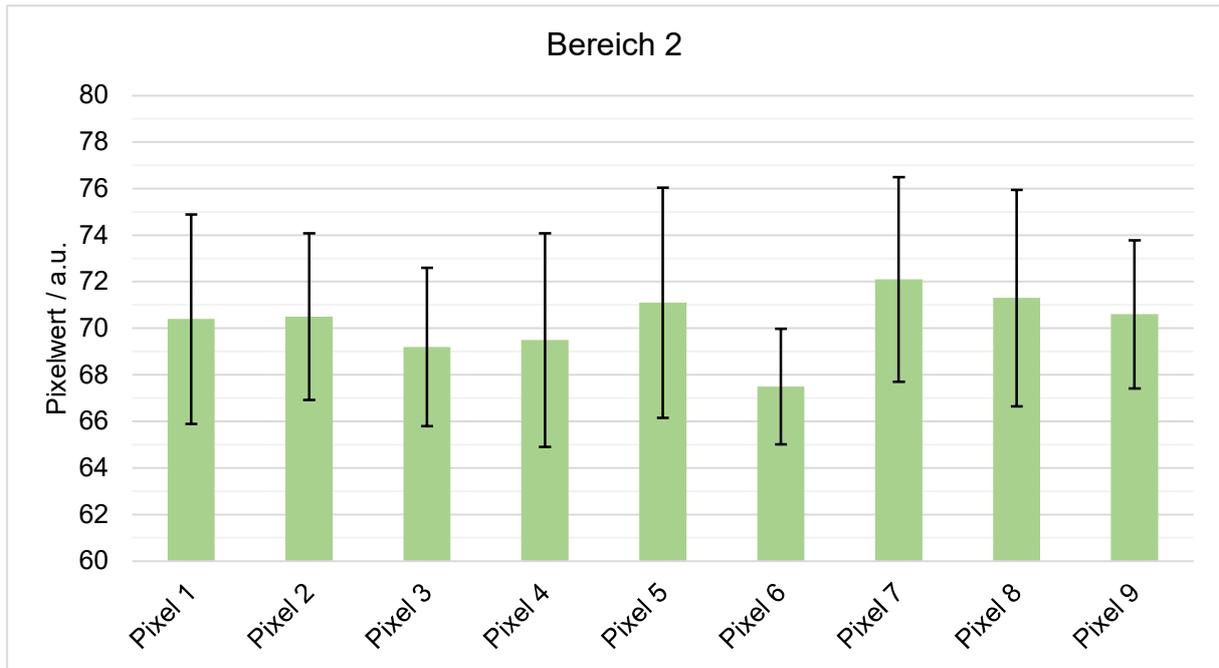


Abbildung 71: Standardabweichung der einzelnen Pixel von Bereich 2 der Raman-Messung.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Abweichungen bei allen Pixeln relativ einheitlich und beträchtlich groß sind. Die Messwerte in Bereich 2 weisen somit eine hohe Schwankung auf. Im Vergleich zu Bereich 1 der Raman-Messungen bewegen sich die Abweichungen im ähnlichen absoluten Bereich von $\pm 4,9$ bei Pixel 5. Pixel 6 bildet eine Ausnahme, da hier die Abweichung mit $\pm 2,5$ am geringsten ist und somit von dem üblichen Muster abweicht. Insgesamt sind die Abweichungen jedoch recht gering. Die Tatsache, dass die Abweichungen bei den Pixeln vergleichsweise einheitlich sind, deutet darauf hin, dass die Messungen insgesamt konsistente und zuverlässige Ergebnisse liefern. Obwohl die Abweichungen beträchtlich groß sind, ist es wichtig zu beachten, dass die relativen Abweichungen dennoch gering ausfallen. Daraus lässt sich schließen, dass die Messungen zwar eine gewisse Variation aufweisen, jedoch immer noch innerhalb eines tolerierbaren Bereichs liegen und somit . Nachfolgend wird Bereich 3 in Abbildung 72 ausgewertet.

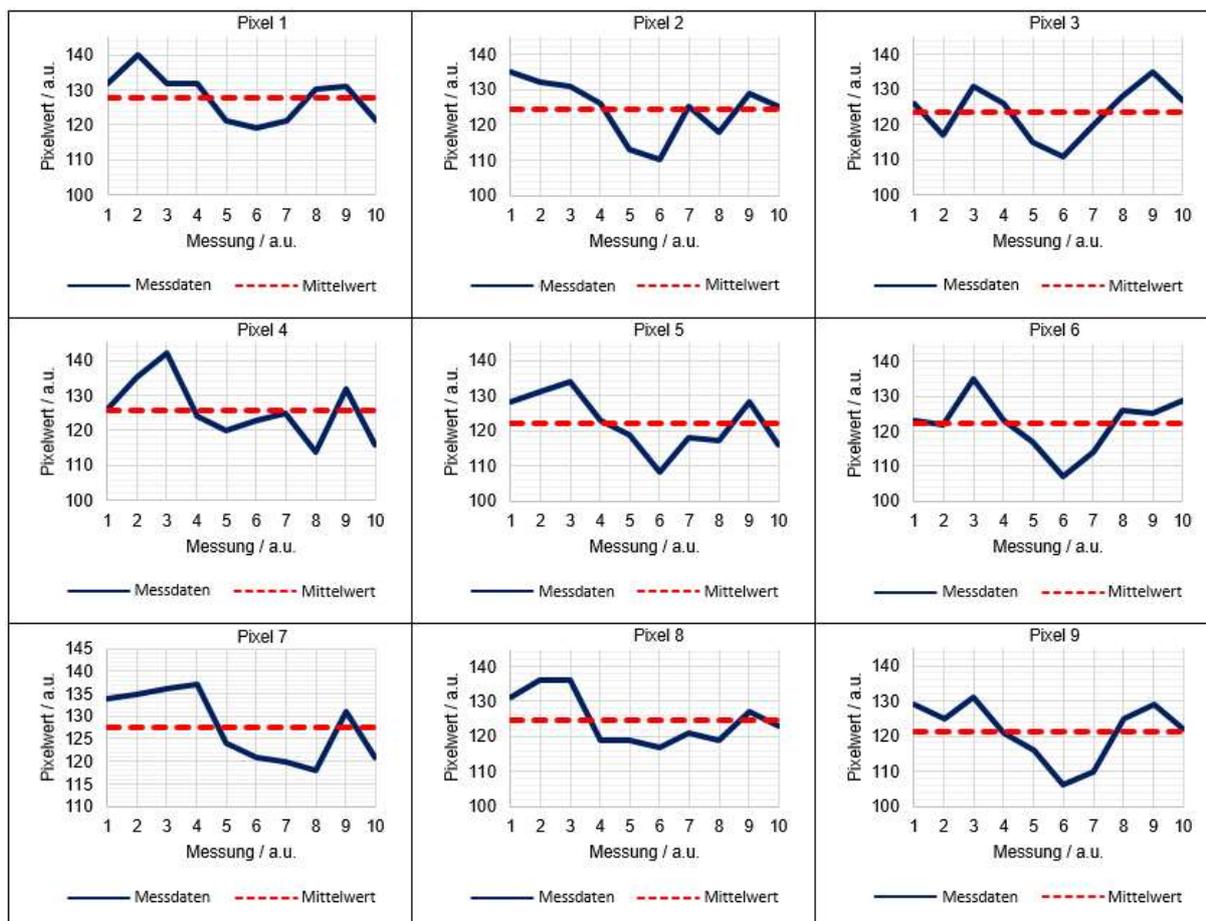


Abbildung 72: Ermittelte Messdaten, dargestellt durch die blaue Linie, der einzelnen Pixel in Bereich 3 der Raman-Messung. Die rote Linie gibt den berechneten Mittelwert an. Die Anordnung der Felder entspricht der Anordnung der Pixel in den entsprechenden Bereichen von Bild b) in Abbildung 61.

Im Vergleich zu den anderen beiden Bereichen weist Bereich 3 der Raman-Messungen die höchste durchschnittliche Intensität auf, mit einem Mittelwert von rund 125. Der minimale Pixelwert beträgt 110 (Messung 6, Pixel 2), während der maximale Wert bei 142 (Messung 3, Pixel 4) liegt. Die größte Spanne zwischen zwei Werten tritt zwischen Messung 3 und 4 bei Pixel 8 mit einem Unterschied von 17 auf. Im Gegensatz zu den Bereichen 1 und 2 der Raman-Messungen zeigt Bereich 3 keine herausragende Messung in Bezug auf ein Minimum oder Maximum der Messwerte. Die Variationen scheinen relativ gleichmäßig und keine spezielle Messung sticht besonders hervor. Die relativen Abweichungen, die auf den Durchschnittswert bezogen sind, variieren zwischen 0,24 % (Messung 1, Pixel 4) und 12,97 % (Messung 3, Pixel 4), wobei die maximale Spanne bei 19,93 % (Pixel 2) liegt. Diese relativen Abweichungen zeigen, dass die Intensität der Pixel in Bereich 3 im Vergleich zum Durchschnittswert geringfügig schwankt, jedoch einige Ausreißer auftreten können. Die Darstellung der Standardabweichung in Abbildung 73 ermöglicht eine visuelle Einschätzung der Streuung der Messwerte in Bereich 3.

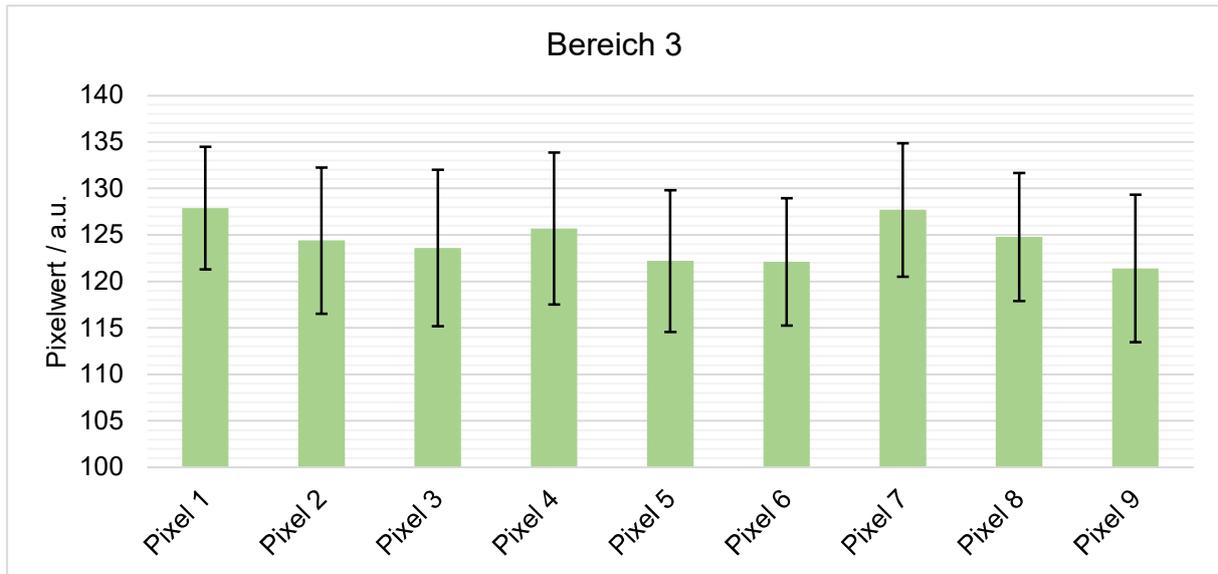


Abbildung 73: Standardabweichung der einzelnen Pixel von Bereich 3 der Raman-Messung.

In Bereich 3 sind die Standardabweichungen gleichmäßig über alle Pixel verteilt, und es gibt keine signifikanten Ausreißer. Die maximale Standardabweichung von $\pm 8,4$ bei Pixel 3 ist im Vergleich zu den Bereichen 1 und 2 der Raman-Messungen immer noch in derselben Größenordnung zu finden. Dies deutet darauf hin, dass die Variation der Messdaten in Bereich 3 ähnlich ist und sich innerhalb eines vergleichbaren Bereichs bewegt. Die Tatsache, dass die Standardabweichungen gleichmäßig über alle Pixel verteilt sind, legt nahe, dass die Messdaten in Bereich 3 eine stabile und reproduzierbare Natur aufweisen. Die niedrige Varianz deutet darauf hin, dass die Messungen konsistent sind und zuverlässige Ergebnisse liefern.

Ein Vergleich der Messsignale von Rayleigh- und Raman-Einstellungen zeigt deutlich, dass die Raman-Einstellungen wesentlich stabilere und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die Abweichungen bei den Raman-Messungen liegen in der Regel im mittleren einstelligen Prozentbereich, während bei den Rayleigh-Messungen Abweichungen im niedrigen bis mittleren zweistelligen Prozentbereich üblich sind. Dies deutet darauf hin, dass die Raman-Messungen eine geringere Variation und eine höhere Konsistenz aufweisen. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die Rayleigh-Messungen im Vergleich zu den Raman-Messungen deutlich höhere Pixelintensitäten aufweisen. Dies könnte auf bestimmte physikalische Eigenschaften des Rayleigh-Streuungsphänomens zurückzuführen sein. Trotz der höheren Intensitäten gehen die Rayleigh-Messungen mit einer größeren Variation und geringeren Stabilität der Pixelwerte einher. Im Gegensatz dazu zeigen die Pixelwerte der Raman-Messungen eine stärkere Variation und sind nicht so stabil wie bei den Rayleigh-Messungen. Dennoch ermöglichen die Raman-Einstellungen reproduzierbare Messungen von großer Bedeutung. Die Raman-Konfiguration stellt somit eine stabilere Grundlage für genaue und

reproduzierbare Messungen dar, was insbesondere in wissenschaftlichen Analysen und Forschungsarbeiten von Nutzen ist.

3.1.10 Spektrometer-Stabilität und Mindestsignalintensität

Zur Beurteilung des Rauschuntergrunds des Raman-Spektrometers und zur Berechnung des notwendigen SNR der Raman-Messungen wird eine Stabilitätsmessreihe durchgeführt. Hierfür werden sowohl für Laser 1 als auch für Laser 2 je drei Wellenlängen mit dem AOTF ausgewählt und pro ausgewähltem Bereich 10 Messungen aufgenommen. Die Probenkammer ist leer, sodass nur das Hintergrundsignal des Messaufbaus detektiert wird. Die Laser sind während der Messung aktiv bei voller Leistung. Auf diese Weise werden gleichzeitig auftretende Störsignale erfasst, die auf Reflexionen innerhalb der Probenkammer zurückzuführen sind. Diese Reflexionen erzeugen Signale im Spektrum, die theoretisch aufgrund der außerhalb des Detektionsbereichs des Spektrometers liegenden Wellenlängen nicht vorhanden sein sollten. Die Integrationszeit der einzelnen Messungen beläuft sich auf 10 s pro Messung. Eine Übersicht der einzelnen Messparameter ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Übersicht der einzelnen Messparameter zur Bestimmung der Spektrometer-Stabilität.

	Laser 1	Laser 2
Wellenlängen (AOTF)	870 nm, 890 nm, 910 nm	800 nm, 820 nm, 840 nm
Laserleistung	200 mW	130 mW
Integrationszeit	10 s	10 s
Wiederholungen	10	10

Die gemittelten Ergebnisse der einzelnen Messreihen sind in Abbildung 74 gezeigt. Ein über alle Messreihen berechneter Mittelwert des Rauschverhaltens ist in roter Farbe dargestellt.

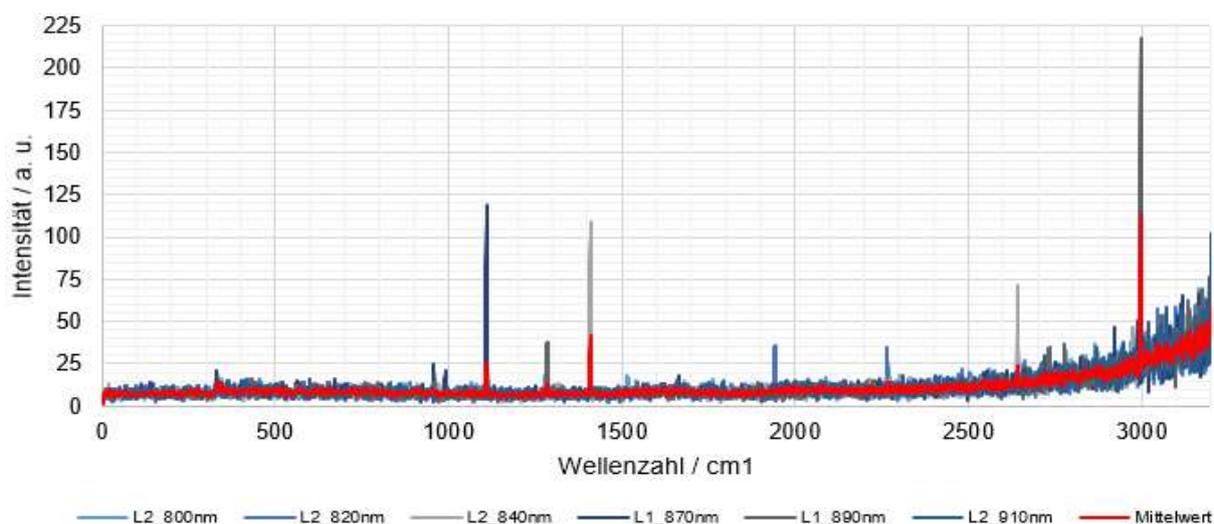


Abbildung 74: Stabilitätsmessung und Rauschverhalten des Tec5-Raman-Spektrometers. Bei einer Integrationszeit von 10 s wird das Rauschen detektiert und gemittelt dargestellt. Das rote Spektrum stellt den errechneten Mittelwert über alle Messreihen dar.

Die Messungen zeigen, dass das Spektrometer im Bereich von 0 bis 2500 cm^{-1} ein durchschnittliches Grundrauschen von 8,2 Counts mit einer Standardabweichung von 1,97 Counts besitzt. Ab einem Bereich von 2700 cm^{-1} steigt das Rauschsignal exponentiell an. Dies liegt an dem integrierten Siliziumdetektor, der in höheren Wellenlängenbereichen ein stärkeres Rauschsignal aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber dem Energieniveau von Photonen besitzt.¹⁷¹ Ab einer Grenzwellenlänge von 1000 nm sinkt die Empfindlichkeit von Silizium rapide und erzeugt dadurch ein exponentiell ansteigendes Rauschsignal.¹⁷² 1000 nm entsprechen einem Raman-Shift von 2700 cm^{-1} bei einem Anregungslaser von 785 nm. Da die Detektion der Raman-Signale im LSRM primär im Bereich von 0 bis 2500 cm^{-1} stattfindet, kann dieser Bereich als stabil angesehen werden. Für eine eindeutige Detektion von Raman-Signalen wird ein $\text{SNR} \geq 2$ benötigt.⁷² Dies bedeutet, dass die Signale mindestens doppelt so groß ist wie das Rauschen. Für das LSRM impliziert dies, dass eine minimale Intensität von 20 Counts erforderlich ist, um Raman-Signale zu detektieren. Die signifikanten Peaks im Spektrum bei 1112, 1408 und 2997 cm^{-1} , die sich im Mittelwert abbilden, weisen darauf hin, dass an diesen Stellen ein Pixelfehler der Detektionszeile vorliegt. Da es sich jedoch um einzelne Pixel handelt, besteht die Möglichkeit der mathematischen Elimination der fehlerhaften Werte bei der Auswertung der generierten Spektren über mathematische Funktionen, wie z. B. der Integralrechnung.^{173,174}

3.2 Software-Entwicklungen

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieses Projekts entwickelten Softwarekomponenten präsentiert. Es wird eine detaillierte Darstellung der Funktionen und Anwendbarkeit dieser Softwareelemente aufgezeigt. Dabei werden die verschiedenen Module erklärt, die in der Software implementiert sind, um die Datenanalyse, Bildverarbeitung und Visualisierung zu unterstützen. Besonderes Augenmerk wird auf die Benutzerfreundlichkeit der Software gelegt. Die vorgestellten Softwareelemente bieten eine maßgeschneiderte Lösung für die spezifischen Anforderungen des LSRM und ermöglichen eine effektive Verarbeitung und Interpretation der erfassten Daten. Durch die detaillierte Darstellung der Softwareelemente wird ein tieferes Verständnis für ihre Funktionen und Potenziale vermittelt und ihre Anwendbarkeit in zukünftigen Studien und Experimenten verdeutlicht.

3.2.1 Ansteuerung der Komponenten

Die zentrale Steuersoftware des LSRM ist unter Verwendung von Python 3 entwickelt worden. Die grafische Benutzeroberfläche (GUI) entstand mithilfe des plattformübergreifenden Anwendungsframeworks und GUI-Toolkits Qt. Diese Entscheidung ermöglicht eine flexible und effiziente Entwicklung von Programmen und Benutzeroberflächen, die auf verschiedenen Betriebssystemen lauffähig sind.¹⁷⁵ Die entwickelte Software, die den Namen „Raman James“

trägt, integriert die Steuerung aller Achsen der Verfahrinheit, des Filtrerrads und der sCMOS-Kamera. Die Laser und der AOTF werden weiterhin über die spezifischen Softwarelösungen der Hersteller gesteuert, da hier sicherheitsrelevante Aspekte berücksichtigt werden müssen. Alle Komponenten sind über eine serielle Schnittstelle mit einem PC verbunden, um eine effektive Kommunikation und Koordination zu gewährleisten.

Abbildung 75 zeigt die grafische Benutzeroberfläche (GUI) der entwickelten Steuersoftware. Sie ist in verschiedene Funktionsbereiche unterteilt, die von a) bis f) gekennzeichnet sind. Diese Bereiche bieten dem Benutzer verschiedene Anzeigen, um die gewünschten Messungen und Experimente durchzuführen. Die GUI wurde entworfen, um eine benutzerfreundliche und intuitive Bedienung des Laser Scanning Raman Mikroskops zu ermöglichen und gleichzeitig eine effiziente Verwaltung der verschiedenen Komponenten und Funktionen zu gewährleisten.

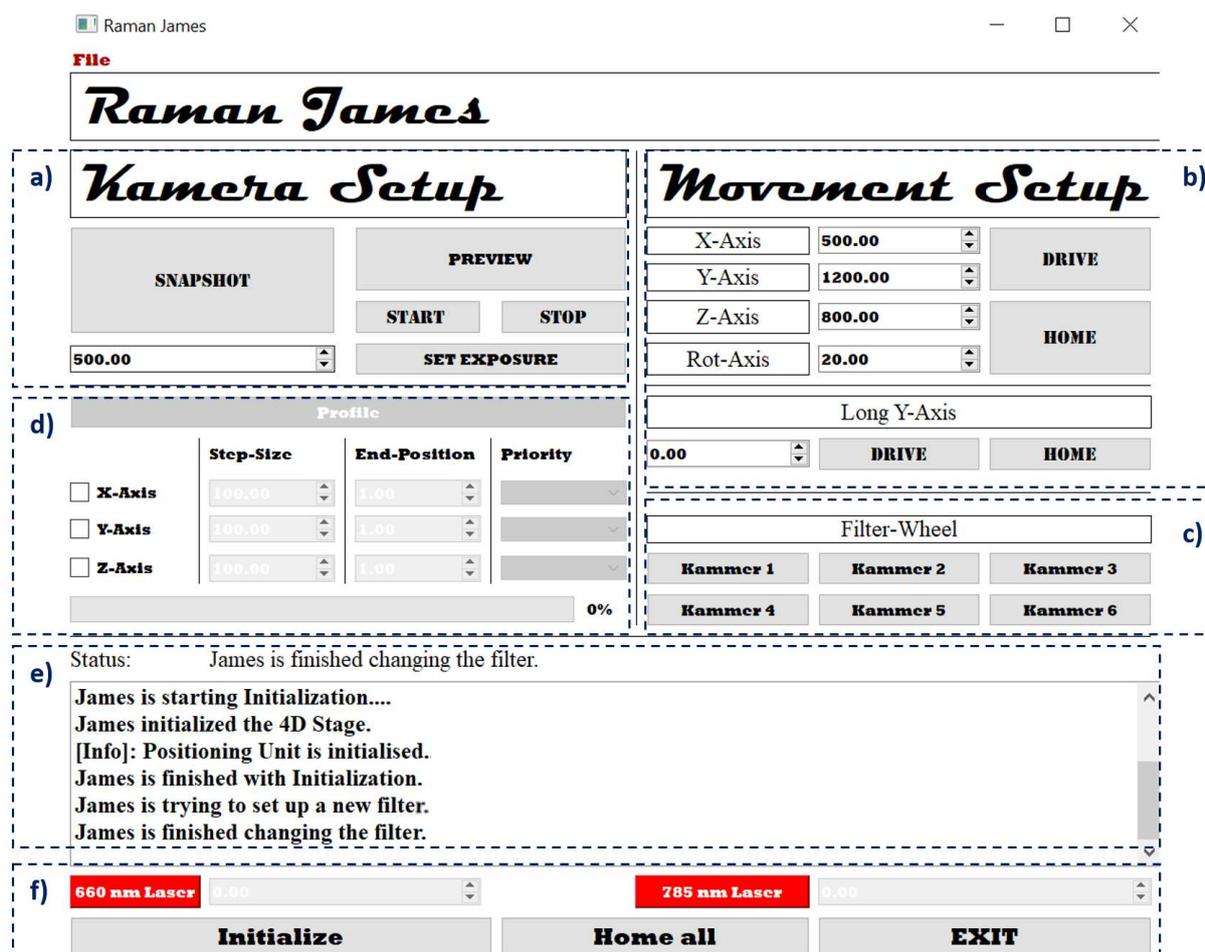


Abbildung 75: Grafische Benutzeroberfläche der entwickelten Software zur Ansteuerung einzelner Komponenten mit eingezeichneten Funktionsbereichen.

In Bereich a) der GUI befinden sich die Funktionen für die Steuerung der sCMOS-Kamera, die als „Kamera Setup“ bezeichnet werden. In einem beschreibbaren Feld kann die Beleuchtungszeit der Kamera in Millisekunden (ms) eingegeben werden. Durch Klicken auf den „Set

Exposure"-Button wird die eingestellte Zeit übernommen und als hexadezimal codierter Befehl an die Kamera gesendet. Dadurch wird die Belichtungszeit entsprechend eingestellt. Die Snapshot-Funktion ermöglicht die Aufnahme und Darstellung einzelner Bilder. Beim Aufrufen dieser Funktion öffnet sich ein statisches Pop-Up-Fenster, das die aufgenommenen Bilddaten anzeigt. Abbildung 76 veranschaulicht diese Darstellung. Um eine bessere Sichtbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, kann über die rechte Skala eine Anpassung der Grauwertspreizung vorgenommen werden. Diese manuelle Anpassung richtet sich nach den jeweiligen Messanforderungen und dient der verbesserten Visualisierung der durchgeführten Messung. Die aufgenommenen Daten werden im Originalformat, also ohne manuelle Bearbeitung, an einem vordefinierten Speicherort im Code abgelegt. Dadurch wird sichergestellt, dass die Daten in ihrer ursprünglichen Form gespeichert und für weitere Analysen oder Verarbeitungsschritte zugänglich bleiben.

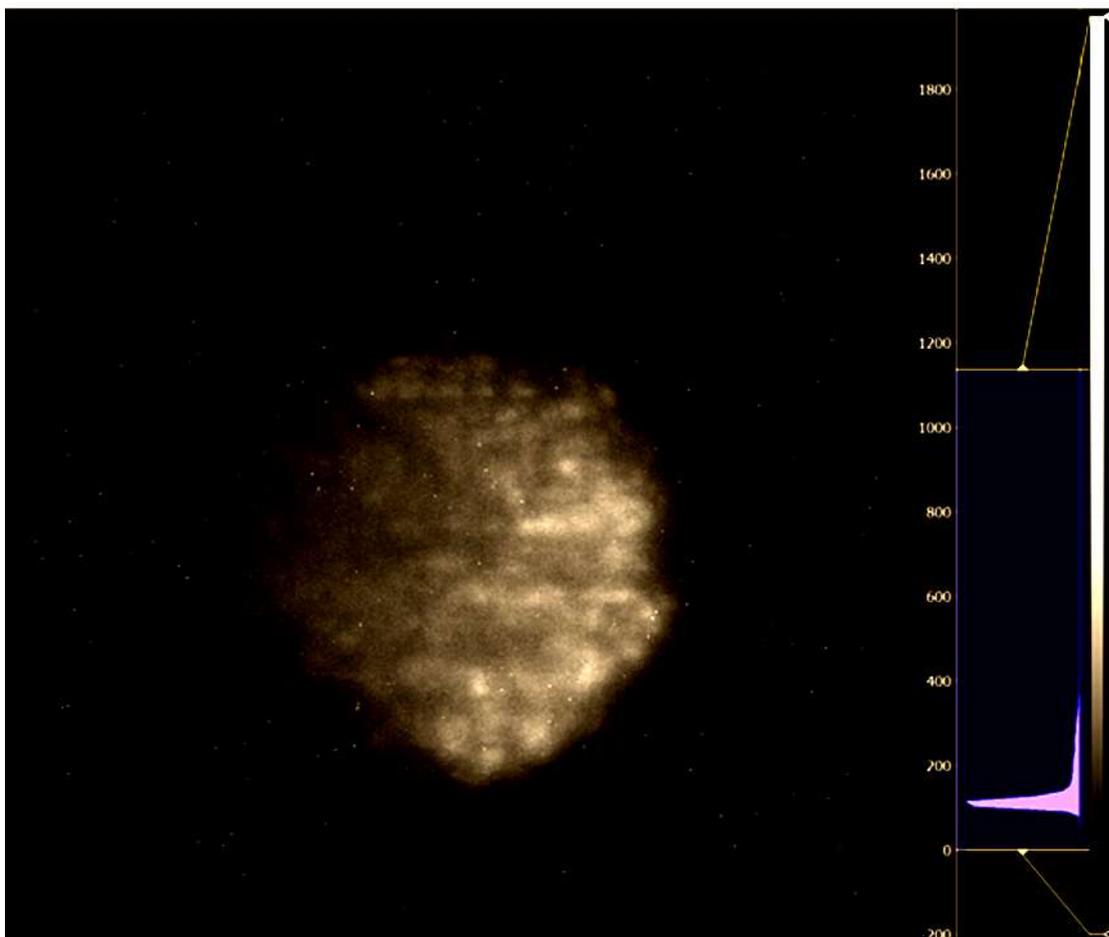


Abbildung 76: Pop-Up-Fenster bei der Bildaufnahme. Die Skala mit der Verteilung der Pixelwerte (rechte Seite) ermöglicht eine variable Spreizung der Grauwerte in den für das Bild passenden Rahmen.

In Bereich b) der GUI befindet sich die Steuerung der einzelnen Achsen, die als „Movement Setup“ bezeichnet wird. Hier kann die präzise Positionierung der Achsen vorgenommen werden. Die anzufahrenden Positionen der Achsen werden in den entsprechenden beschreibbaren Feldern als Absolutwerte eingegeben. Die Einheit für die X-, Y- und Z-Achse

wird in ganzzahligen Steps angegeben, wobei ein Step einer Größe von $1,47\ \mu\text{m}$ entspricht, wie im Kapitel 3.1 über die Verfahrengenauigkeit und Schrittweite der Achsen dargestellt. Die Rotationsachse der Verfahreinheit, auch als „Rot-Axis“ bezeichnet, wird in Grad angegeben. Die kleinste Schrittweite für diese Achse beträgt $1,8^\circ$.¹⁴¹ Die „Rot-Axis“ dient zur Einstellung der Orientierung der Probe in Bezug auf die Lichtblattbeleuchtung.

Die Long Y-Achse hingegen verwendet die Schrittweite in Mikrometern (μm) und kann auf $0,5\ \mu\text{m}$ eingestellt werden. Die unterschiedlichen Eingabeformate sind durch Vorgaben der jeweiligen Hersteller bedingt.^{141,142} Nachdem die gewünschten Positionen eingegeben wurden, können sie durch Betätigen des „Drive“-Buttons angefahren werden. Um die Achsen auf den Endanschlag zurückzufahren und in die Ausgangsposition zu bringen, sind die beiden „Home“-Buttons integriert. Das Zurückfahren auf den Endanschlag betrifft jeweils das entsprechende Segment der Verfahreinheit und betrifft alle Achsen, die in diesem Segment integriert sind. Die Steuerung des Filterrads befindet sich in Bereich c) der GUI. Durch Betätigen der jeweiligen Buttons mit den entsprechenden Nummern wird die Kammer des Filterrads ausgewählt und das darin befindliche Filterelement im Detektionspfad positioniert. Da die verwendeten Filter je nach Anwendung variieren, ist die Bezeichnung neutral gehalten.

Das Kernelement der Steuersoftware ist die Profile-Funktion in Bereich d). Mit dieser Funktion können Messreihen automatisiert durchgeführt werden, basierend auf den eingestellten Parametern. Im ersten Schritt wird über das Auswahlménü die Achse für die Messreihe festgelegt. Die Felder für die nicht ausgewählten Achsen werden inaktiv dargestellt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, bei erneutem Klick auf die ausgewählte Achse diese Option rückgängig zu machen. Optional können auch mehrere Achsen ausgewählt werden, sodass die Messreihe über mehrere Achsen verfahren wird. In den beschreibbaren Feldern unter dem Reiter „Step-size“ wird die Schrittweite angegeben, mit der sich die Achse während der Messung bewegen soll. Diese Schrittweite gibt den Abstand zwischen zwei aufgenommenen Bildern an. Wie zuvor erwähnt, entspricht ein Schritt einer Verschiebung von $1,47\ \mu\text{m}$, und dies gilt auch für die einzelnen Funktionen der X-, Y- und Z-Achse gilt. Unter dem Feld „Endposition“ wird die Zielposition der Achsen eingegeben. Der Startpunkt für die Messungen ist die zuletzt über Bereich b) eingestellte Position aller Achsen. Die Profile-Funktion verfährt daher alle Achsen vom Startpunkt aus mit den Schritten gemäß der eingestellten Schrittweite, bis die Zielposition erreicht ist. Ist der Fahrweg nicht ganzzahlig durch die Schrittweite teilbar ist, wird die Anzahl der möglichen Schritte automatisch aufgerundet, sodass die Endposition auf jeden Fall erreicht wird. So wird sichergestellt, dass der Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten konstant bleibt. Bei mehrachsigen Messungen wird unter dem Feld „Priority“ die Reihenfolge der Achsenbewegungen von 1 bis 3 festgelegt. Die niedrigste Zahl beginnt mit der Bewegung zum Zielpunkt. Sobald dieser erreicht ist, verfährt die Priorität 2 um einen Schritt, während Priorität 1 zurückgesetzt und erneut verfährt. Priorität 3 verfährt erst, wenn Priorität 1 und 2

jeweils zurückgesetzt wurden. Dadurch wird die Funktion einer dreidimensionalen Vermessung von großflächigen Proben ermöglicht. Die Profile-Funktion wird durch Betätigen des „Profile“-Buttons gestartet und kann nicht ohne Beendigung des Programms gestoppt werden. Ein Fortschrittsbalken zeigt den Fortschritt der Messreihe in Prozent an, um eine bessere Abschätzung des zeitlichen Aufwands zu ermöglichen.

In Bereich e) der GUI befindet sich eine Infoanzeige, in der die aktuellen relevanten Schritte der Software dargestellt werden. Eine History-Funktion speichert alle Schritte der Software, sodass sie bei Bedarf nachgelesen werden können. Dies soll den Verlust einzelner Messpositionen vermeiden. Bereich f) umfasst die grundlegenden Funktionen der Software. Durch Betätigen des „Initialize“-Buttons werden im ersten Schritt nach dem Start des Programms alle Komponenten initialisiert und überprüft, ob alle Schnittstellen funktionsfähig sind. Der „Home all“-Button bewirkt, dass alle Achsen der Verfahrenseinheit gehomed und somit referenziert werden. Um die Software zu beenden, wird der „Exit“-Button betätigt. Dadurch werden alle Komponenten deinitialisiert und die Schnittstellen freigegeben. Anschließend wird die GUI automatisch geschlossen. Die Infofelder „660 nm Laser“ und „785 nm Laser“ sind für eine spätere Implementierung der Laser in Form einer Zustandsüberwachung vorgesehen.

3.2.2 Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitungssoftware besteht aus mehreren Modulen: Plotter, Cropping und Backgroundremoval. Diese Module sind individuell konfigurierbar und in Python 3 geschrieben. Das Modul Plotter hat die Aufgabe, die akquirierten Spektren mit den aufgenommenen Rohbildern zu verbinden. Es verfügt über eine grafische Benutzeroberfläche (GUI), wie in Abbildung 77 dargestellt. Der Plotter wertet die Spektren in den eingestellten Bereichen aus, abhängig von den zu untersuchenden Molekülbindungen. Dabei wird dem höchsten Signalpeak im Spektrum der höchste Pixelwert zugeordnet. Dadurch wird die ursprüngliche Grauwertspreizung innerhalb der monochromen Bilder von 0 bis 65535 auf 0 bis zum jeweiligen Maximalwert innerhalb der aufgenommenen Messreihe reduziert. Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung des Kontrasts innerhalb der aufgenommenen Bilder.

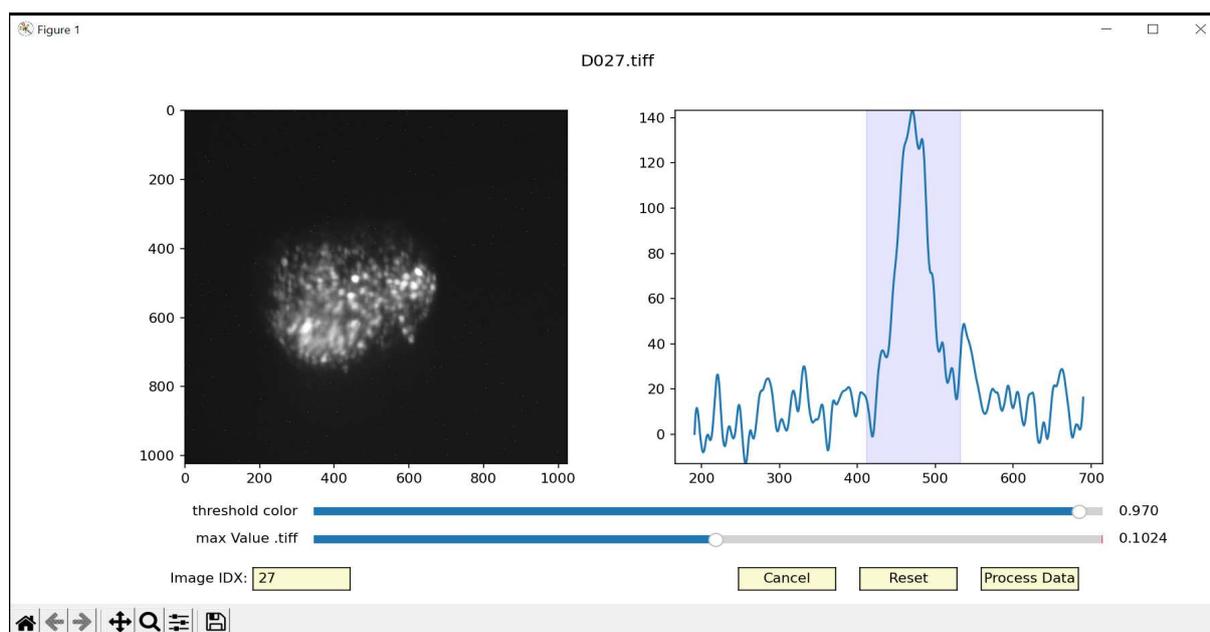


Abbildung 77: Grafische Benutzeroberfläche des Moduls *Plotter* der Bildverarbeitungssoftware.

Die akquirierten Messdaten werden an einem vorgegebenen Speicherplatz gespeichert. Beim Start der Software werden die Bilder und Spektren automatisch anhand der Reihenfolge der Namen zugeordnet. Dabei werden die Maximalwerte aus den einzelnen Kombinationen ermittelt, und der höchste Wert der gesamten Messreihe wird automatisch gespeichert und als Grundlage für die weitere Bearbeitung verwendet. Die Kombination aus Spektrum und Bild mit den höchsten Werten wird automatisch in der GUI angezeigt, und die zugewiesene Indexnummer wird im Feld "Image IDX" dargestellt. Durch manuelles Ändern der Indexnummer können andere Kombinationen angezeigt werden. Die Software bietet die Möglichkeit, die Bilder manuell anzupassen und den Kontrast sowie die Grauwertspreizung weiter zu optimieren. Hierfür stehen die beiden Regler "threshold color" und "max Value.tiff" zur Verfügung. Die eingestellten Werte werden mit dem Button "Process Data" für die gesamte Messreihe übernommen, und alle Bilder werden entsprechend bearbeitet. Dadurch wird sichergestellt, dass es innerhalb einer Messreihe zu keinen Abweichungen im Prozessablauf kommt. Die bearbeiteten Bilder werden an einem separaten Speicherort abgelegt und entsprechen der Darstellung des Plotters in der GUI. Zusätzlich werden die bearbeiteten Spektren gemäß der Abbildung in der GUI gespeichert. Das Standardformat für die Bilder ist .png. Der Button "Reset" setzt alle getätigten Einstellungen auf die Standardwerte zurück, und der Button "Cancel" stoppt das Software-Modul und beendet es. Mit dem Modul "Cropping Images" wird das Bildformat der generierten .png-Bilder geändert. Dabei wird eine Skala am Rand hinzugefügt, um die einzelnen Pixel exakt zu lokalisieren. Diese Skala wird jedoch für die spätere Darstellung im 3D-Modell nicht benötigt. Das Bild wird daher auf eine Größe von 1024 x 1024 Pixel beschnitten, und das Bildformat wird in .tiff geändert. Die Bilder werden

automatisch aus demselben Speicherort geladen, in dem die resultierenden Bilder des Plotters gespeichert sind, und in einen neuen Ordner abgelegt.

Zuletzt werden die Bilder mit dem Softwaremodul "Backgroundremoval" bearbeitet. Das Ziel ist es, den Hintergrund der Bilder zu entfernen und nur die zu untersuchende Probe darzustellen. Die passende GUI des Moduls wird in den Abbildungen 78 und 79 dargestellt.

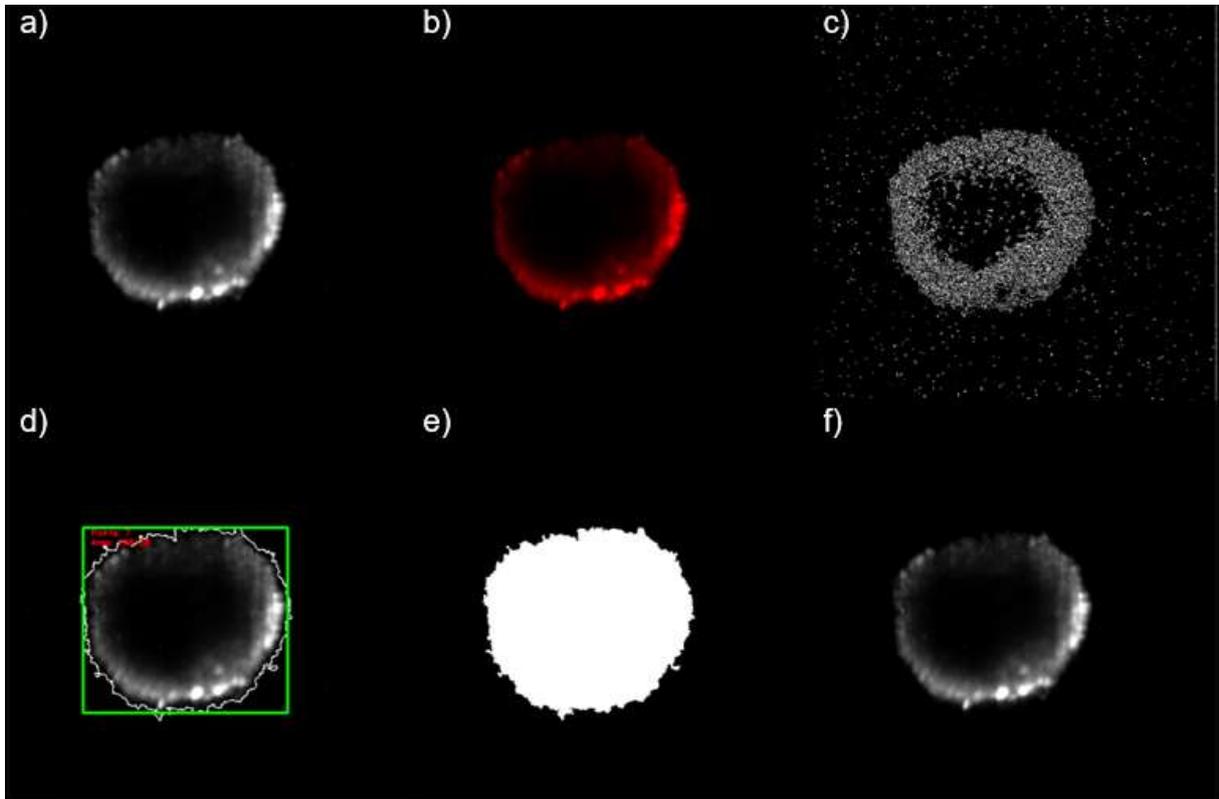


Abbildung 78: Verarbeitung des Bildes in mehreren Schritten a) bis f). Erster Teilausschnitt der GUI des Moduls *Backgroundremoval* der Bildverarbeitungssoftware.

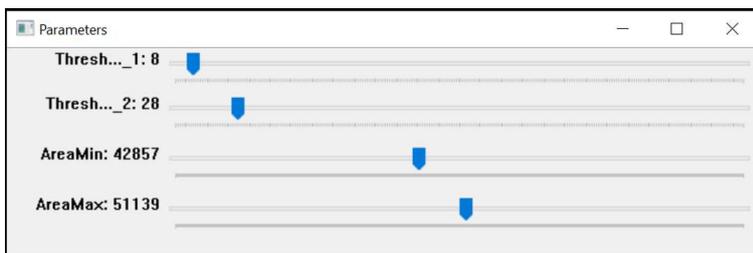


Abbildung 79: Slider zur manuellen Konfiguration der Bilder. Zweiter Teilausschnitt der GUI des Moduls *Backgroundremoval* der Bildverarbeitungssoftware.

Die GUI besteht aus zwei getrennten Fenstern. Im ersten Fenster werden sechs aufeinanderfolgende Teilschritte a) bis f) zur Bearbeitung des Bildes dargestellt. Die Bildverarbeitung erfolgt parallel für alle Bildausschnitte. Im Feld a) wird das Originalbild angezeigt, welches im Schritt b) in ein Falschfarbenbild umgewandelt wird. Hierbei wird ein HSV-Filter verwendet, der das Bild innerhalb definierter Grenzwerte in die drei Bereiche des

Farbwerts (Hue), der Farbsättigung (Saturation) und des Hellwerts (Value) aufteilt und sie unterschiedlich einfärbt. Dieser Filter bietet den Vorteil, dass die dargestellten Farben besser der menschlichen Farbwahrnehmung entsprechen und Details besser erkennbar sind. Das resultierende Falschfarbenbild wird im Schritt c) weiterbearbeitet. Dabei kommt ein Canny-Filter zum Einsatz, der verschiedene Ebenen zur Kantendetektion in Bildern bietet. Aufgrund seines robusten Algorithmus zur Kantendetektion ist der Canny-Filter weithin anerkannt und liefert idealerweise ein Bild, in dem nur noch die Kanten des ursprünglichen Bildes sichtbar sind.¹⁷⁶ Das Ergebnis des Canny-Filters wird im Schritt c) dargestellt.

Im Schritt d) werden die erkannten Kanten mithilfe eines Konturerkennungs-Plug-Ins automatisch detektiert und mit einem grünen Rahmen markiert. Gleichzeitig wird in roter Schrift die Größe des markierten Bereichs angezeigt, welche durch die Anzahl der Pixel innerhalb des Bereichs beschrieben wird. Mithilfe einstellbarer Grenzwerte besteht die Möglichkeit, einzelne Bereiche anhand ihrer Größe zu selektieren. Im Schritt e) wird aus der erkannten Kontur eine binäre bzw. monochrome Maske erstellt, bei der die Pixel innerhalb der Kontur den Wert 1 bzw. Weiß erhalten, während die Pixel außerhalb den Wert 0 bzw. Schwarz erhalten. Das Originalbild aus Schritt a) wird mit dieser Maske mittels einer logischen &-Verknüpfung im Schritt f) kombiniert. Das Ergebnis ist ein Bild, das nur die Bereiche darstellt, die durch den Canny-Filter und die Kantendetektion identifiziert wurden, während der Hintergrund ausgeblendet wird.

Die Anpassung der Grenzwerte für die einzelnen Bildbearbeitungsmethoden erfolgt mithilfe der Regler in der Software. Diese Grenzwerte werden in Echtzeit auf die Bilder angewendet. Der Threshold_1-Regler legt die untere Grenze und der Threshold_2-Regler die obere Grenze für den HSV-Filter fest. Die entsprechenden Grenzwerte werden automatisch vom Canny-Filter übernommen. Die Regler AreaMin und AreaMax bestimmen die Grenzwerte für die Konturerkennung. Eine Kontur wird nur dann erkannt und angezeigt, wenn ihre Größe innerhalb dieser Grenzwerte liegt. Jeder Regler kann individuell für jedes Bild in der Messreihe angepasst werden. Es ist wichtig anzumerken, dass die Software den Hintergrund entfernt, ohne die Pixelintensität zu verändern. Dadurch kann jedes Bild individuell bearbeitet werden, ohne das Messergebnis zu verfälschen.

Die Software wird über Tasteneingaben gesteuert. Mit den Tasten A und D kann zwischen den einzelnen Bildern der Messreihe gewechselt werden. Jedes Bild ist mit einer Index-Nummer versehen, die durch Drücken der entsprechenden Taste erhöht (D) oder verringert (A) wird. Durch Drücken der S-Taste wird der aktuelle Bearbeitungsstand des Bildes an einem festgelegten Speicherort gespeichert. Bei erneutem Drücken der Taste wird das Bild überschrieben. Die Q-Taste beendet die Software und schließt die dazugehörigen Fenster.

3.2.3 3D-Rekonstruktionssoftware

Die dreidimensionalen Darstellungen der Sphäroide werden mithilfe eines Python-basierten Plug-Ins namens Napari erstellt. Napari ist ein speziell für den wissenschaftlichen Bereich entwickelter multidimensionaler Bildbetrachter.¹⁷⁷ Dieses Modul zeichnet sich durch seine leichte Integration mit anderen bildverarbeitenden Softwarelösungen aus und bietet die Möglichkeit, Daten in verschiedenen Ansichten darzustellen. Vor der dreidimensionalen Darstellung des Datensatzes ist jedoch eine Vorverarbeitung erforderlich. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften des LSRM, insbesondere der Lichtblattdicke, die den Abstand zwischen den einzelnen Bildern bestimmt, entstehen Lücken zwischen den Bildebenen. Diese Lücken sind notwendig, da eine direkte Darstellung der Bildebenen zu einer gestauchten Darstellung der Probe im Modell führen würde. Das Problem besteht jedoch darin, dass in diesen Lücken keine Messdaten vorhanden sind. Bei der Erzeugung des 3D-Modells würde dies dazu führen, dass bei einer Drehung des Modells einzelne Ebenen ohne Zusammenhang dargestellt werden. Um dies zu vermeiden, erfolgt eine Interpolation zwischen den einzelnen Bildebenen.¹⁷⁸ Bei der Interpolation werden die leeren Ebenen mit Zwischenwerten aufgefüllt. Dabei werden die Werte zwischen zwei Bildebenen mithilfe einer linearen Interpolation berechnet, wobei der Verlauf der Farbwerte berücksichtigt wird. In der Standardmessung des LSRM mit einer Lichtblattdicke von $8\ \mu\text{m}$ ergibt sich beispielsweise ein Leerraum von 7 Ebenen zwischen den Bildebenen, da eine Ebene einer Dicke von $1\ \mu\text{m}$ entspricht. Eine schematische Darstellung der Vorverarbeitung der Bilddaten ist in Abbildung 80 zu sehen. Die eingezeichneten Interpolationsgeraden zeigen den schematischen Verlauf der Farbwerte zwischen den Bildebenen.

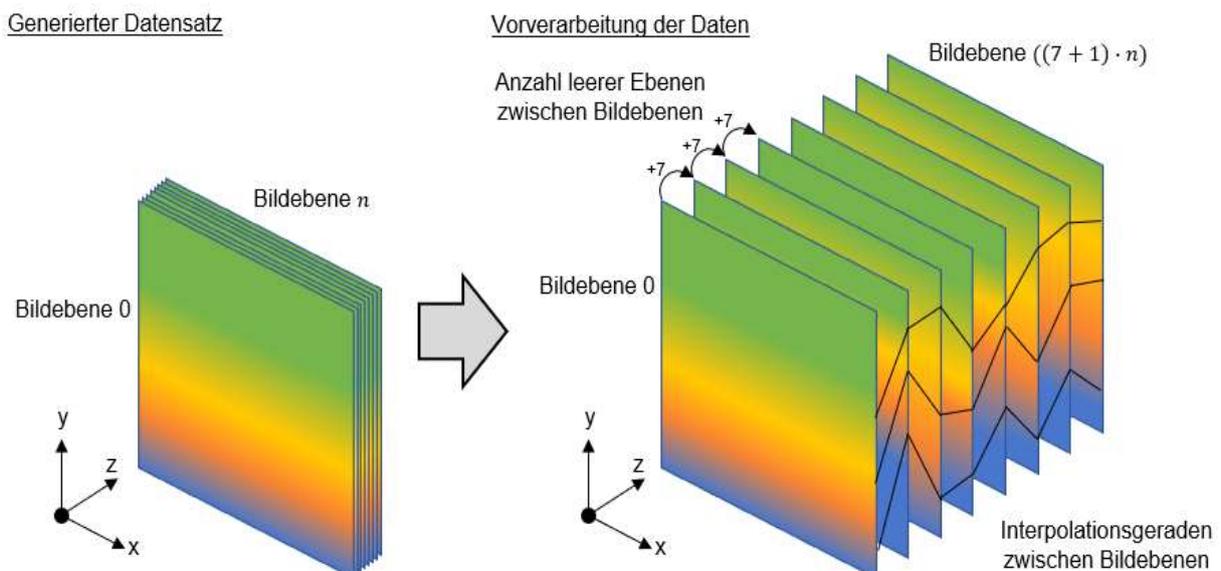


Abbildung 80: Schematische Darstellung der Bildvorverarbeitung zur Generierung des 3D-Modells anhand von linearer Interpolation zwischen den einzelnen Bildebenen.

Nach Abschluss der Vorverarbeitung wird der Datensatz aufgrund der eingefügten Ebenen um den Faktor 7 vergrößert. Die resultierenden Daten werden anschließend mithilfe der Napari-GUI dargestellt. Abbildung 81 zeigt eine beispielhafte Darstellung der GUI mit der generierten 3D-Rekonstruktion eines HT29-Sphäroids.

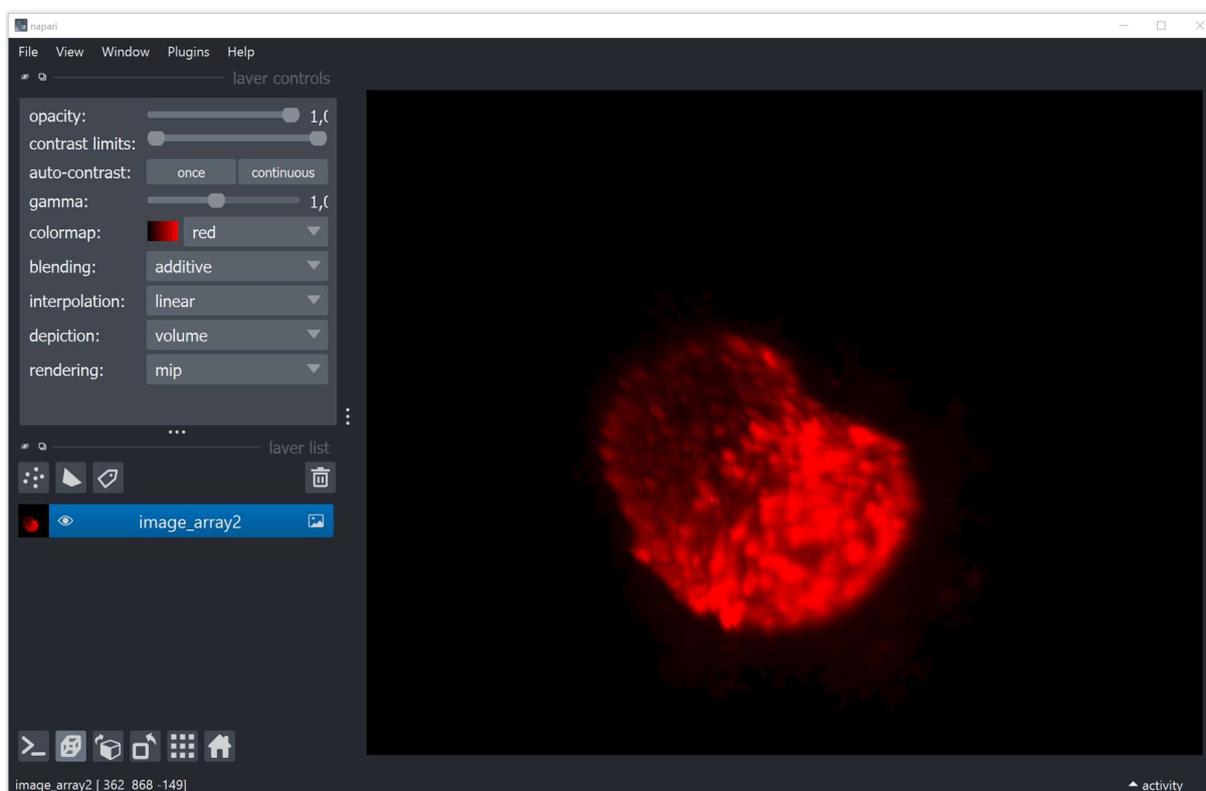


Abbildung 81: Grafische Benutzeroberfläche des Python-Plug-Ins Napari. Das 3D-Modell im rechten Bildfeld zeigt ein HT29-Sphäroid und lässt sich per Mausklick frei bewegen. Das linke Bildfeld dient der Konfiguration der Darstellung.

Die GUI von Napari bietet verschiedene Einstellungsmöglichkeiten auf der linken Seite, um den betrachteten Datensatz entsprechend den Anforderungen anzupassen. Die dargestellten Parameter repräsentieren die Standardwerte. Der aktuell betrachtete Datensatz wird durch einen blau markierten Bereich hervorgehoben. Es besteht die Möglichkeit, mehrere Datensätze parallel einzulesen, die in einer Liste untereinander angezeigt werden. Diese Datensätze können gleichzeitig dargestellt werden, wodurch eine Überlagerung der Bilder entsteht. Die Darstellung kann sowohl dreidimensional als auch zweidimensional erfolgen. Durch einen Tastendruck kann zwischen beiden Sichtweisen gewechselt werden. In der zweidimensionalen Darstellung werden die Ebenen der betrachteten Datensätze übereinandergelegt. Die Messdaten werden im rechten Teil der GUI dargestellt und können durch Mausklicks oder Tastenbefehle an die gewünschten Blickwinkel angepasst werden. Zudem besteht die Möglichkeit, das generierte dreidimensionale Modell zu speichern und in verschiedene Formate zu konvertieren. Mit seiner flexiblen Einstellbarkeit und

benutzerfreundlichen Bedienung erfüllt Napari alle Anforderungen zur Darstellung der generierten Messdatensätze und wird daher beim LSMR eingesetzt.

3.3 Bildaufnahme verschiedener Modalitäten einer 3D-Zellkultur

Das LSMR bietet verschiedene Modalitäten, die zur Vergleichsanalyse von Aufnahmen verwendet werden können. Es wird ein HT29-Fibroblasten-Sphäroid verwendet, um die einzelnen Aufnahmen zu vergleichen. Das Sphäroid wird mithilfe des Probenhalters mittig in der Probenkammer positioniert. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten, wird ein spezifischer Schnitt ausgewählt, der alle Modalitäten zeigt. Dabei erfolgt ein direkter Vergleich der gleichen Modalität bei unterschiedlichen Wellenlängen. Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, die Auswirkungen der unterschiedlichen Wellenlängen der beiden Laser auf die Darstellung des Sphäroids zu untersuchen. Es ermöglicht auch die Beurteilung, ob bestimmte Modalitäten eine bessere Auflösung, Kontrast oder Detailerkennung bieten als andere. Durch den direkten Vergleich wird eine präzise Analyse der Bilder ermöglicht, da potenzielle Unterschiede und Vorzüge der verschiedenen Modalitäten besser identifiziert werden können.

Durch die Betrachtung des Sphäroids in verschiedenen Modalitäten und Wellenlängen können wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden. Dieser Ansatz ermöglicht es, das volle Potenzial des LSMR auszuschöpfen und die optimalen Einstellungen für die spezifische Anwendung und den gewünschten Untersuchungsbereich zu bestimmen. Letztendlich trägt dies dazu bei, die Qualität und Genauigkeit der Bildgebung zu verbessern und ermöglicht neue Einblicke in die untersuchten biologischen Strukturen. Eine Übersicht über die einzelnen Modalitäten ist in Tabelle 8 in Kapitel 2.4 - *Messmethodik* aufgelistet.

3.3.1 Rayleigh-Konfiguration

Für die ersten Aufnahmen der Messreihe wird die sogenannte Rayleigh-Konfiguration verwendet, bei der elastisches Licht genutzt wird. Hierfür werden die Leistungen beider Laser auf 1 mW eingestellt und der AOTF entsprechend auf die Anregungswellenlänge angepasst. Die Integrationszeit der Kamera beträgt 100 ms. In Abbildung 82 sind die Bilder des mittleren Schnitts dargestellt, die mithilfe dieser Konfiguration aufgenommen wurden. Da das elastische Licht in der spektroskopischen Betrachtung die größte Menge an Licht liefert, sind die Bilder in der Rayleigh-Konfiguration im Vergleich zu anderen Modalitäten am hellsten. Das Hauptziel dieser Konfiguration besteht darin, die äußeren Strukturen der Probe zu erkennen und erste molekulare Informationen zu gewinnen.

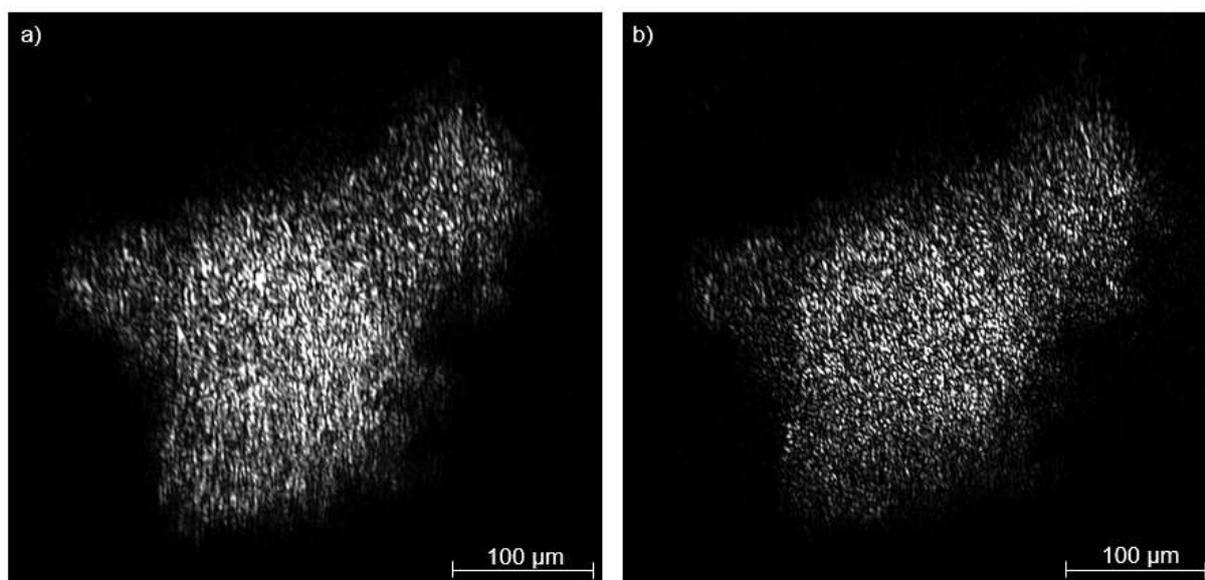


Abbildung 82: Darstellung der Rayleigh-Streuung bei a) 785 nm und b) 660 nm.

Die vorliegenden Bilder ermöglichen eine detaillierte Betrachtung der morphologischen Struktur des Sphäroids im Vergleich zum umgebenden Agarose-Gel-Block, der in schwarz dargestellt ist. Bereits auf den ersten Blick ist ein hellerer Kern innerhalb des Sphäroids erkennbar, der sich deutlich von der umgebenden Umgebung abhebt.

Es ist ersichtlich, dass die Intensitätsverteilung der einzelnen Pixel in den Bildern je nach Anregungswellenlänge variiert. Insbesondere bei einer Anregung mit 785 nm ist eine gewisse Unschärfe der Umrandungen zu beobachten, während bei einer Anregung mit 660 nm schärfere Kanten erkennbar sind. Dies deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Wellenlängen unterschiedliche Informationen über die Struktur und Zusammensetzung des Sphäroids liefern. Trotz der sichtbaren Strukturen gibt es keinen eindeutigen Nachweis einzelner Zellen in den Bildern. Dennoch können anhand der unterschiedlichen Beleuchtungen erste Aussagen über verschiedene Bereiche des Sphäroids getroffen werden. Insbesondere die Intensitätsverteilung der Pixel gibt Aufschluss über die Helligkeit der verschiedenen Bereiche. Bei einer Anregung mit 785 nm erscheint die Verteilung der Intensitätspixel relativ gleichmäßig, während bei einer Anregung mit 660 nm ein bestimmter Bereich im Zentrum heller erscheint. Zusätzlich zur Betrachtung der morphologischen Struktur ermöglicht der vorliegende Bildausschnitt auch eine Abschätzung der Größe des Sphäroids. Durch die geometrischen Eigenschaften der verwendeten Lichtblätter erscheint das Bildzentrum schärfer als die Ränder, da die beleuchtete Fläche in der Mitte geringer ist und dadurch weniger Streulicht vom Detektor erfasst wird. Dieser Effekt kann genutzt werden, um Rückschlüsse auf die Größe und Dimensionen des Sphäroids zu ziehen.

Insgesamt bieten die vorliegenden Bilder einen ersten Einblick in die morphologische Struktur des Sphäroids und liefern wichtige Informationen über seine Helligkeitsverteilung, Größe und mögliche Unterschiede in verschiedenen Bereichen. Weitere modalitätsspezifische

Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um detailliertere Erkenntnisse über die zellulären und molekularen Eigenschaften des Sphäroids zu gewinnen.

3.3.2 Fluoreszenz-Konfiguration

Autofluoreszenz-Messungen stellen eine äußerst nützliche Methode dar, um auf schnelle und nicht-invasive Weise Informationen über die Molekülzusammensetzung von Sphäroiden zu erlangen. Insbesondere bei biologischen Proben beobachtet man in der Regel eine Abnahme der Autofluoreszenz mit zunehmender Raman-Verschiebung, da die Anregungswellenlänge von der optimalen Absorptionsbande der fluoreszierenden Moleküle abweicht. Durch die detaillierte Analyse der Intensitätsverteilung in den Autofluoreszenz-Bildern lassen sich wertvolle Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Moleküle in den Sphäroiden gewinnen. Eine wichtige Anwendung besteht darin, Unterschiede in der Konzentration oder Verteilung spezifischer fluoreszierender Moleküle innerhalb der Sphäroide zu erkennen. Dies ermöglicht eine genauere Charakterisierung der Sphäroide auf molekularer Ebene. Darüber hinaus erlaubt die Analyse von Spektren in der Fachliteratur die Identifizierung spezifischer Emissionswellenlängen, die charakteristisch für bestimmte Moleküle oder molekulare Gruppen sind. Dadurch kann eine präzisere Identifizierung der fluoreszierenden Bestandteile innerhalb der Sphäroide erfolgen, was wiederum wichtige Informationen über die zugrunde liegenden biochemischen Prozesse liefert. Die Autofluoreszenz zeigt bei Anregung nahe der Absorptionswellenlänge Quenching, wobei die Fluoreszenz in Gegenwart anderer Moleküle oder Umgebungen reduziert wird.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Dieses Phänomen entsteht durch Energieübertragung, elektronische Effekte und Sauerstoffwechselwirkung und beeinflusst die Genauigkeit von Fluoreszenz-Messungen, kann aber bewusst für Wechselwirkungsstudien genutzt werden. Trotz Überlagerung mit Raman-Messungen können aus der Abnahme der Autofluoreszenz wertvolle Erkenntnisse über die Zusammensetzung von biologischen Proben gewonnen werden, wie z. B. Veränderungen in Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, die auf metabolische Veränderungen oder oxidative Stressreaktionen hinweisen können. Zudem ermöglicht die Abnahme der Autofluoreszenz auch Rückschlüsse auf eine mögliche Veränderung der Zelltypen oder der chemischen Umgebung der Probe. Die Messungen wurden ohne spezielle Probenpräparation durchgeführt, was eine effiziente Untersuchung der Molekülzusammensetzung von Sphäroiden in ihrer natürlichen Umgebung ermöglicht.

Sowohl Laser 1 mit einer Leistung von 200 mW als auch Laser 2 mit einer Leistung von 130 mW wurden verwendet. Die Integrationszeit betrug für jedes Bild 1000 ms und für jedes Spektrum 20 s. Der AOTF wurde entsprechend der Anregungswellenlänge auf drei verschiedene Raman-Verschiebungen eingestellt: 500 cm^{-1} , 750 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} . Die detaillierten Ergebnisse der Messungen mit Laser 1 sind in Abbildung 83 veranschaulicht. Die dargestellten Autofluoreszenz-Bilder offenbaren die natürliche fluoreszierende Aktivität der

Sphäroide. Durch die gezielte Variation der Raman-Verschiebung können spezifische fluoreszierende Moleküle oder Molekülgruppen selektiv angeregt werden, was eine präzise Analyse und Aufschlüsselung der Zusammensetzung der Sphäroide ermöglicht.

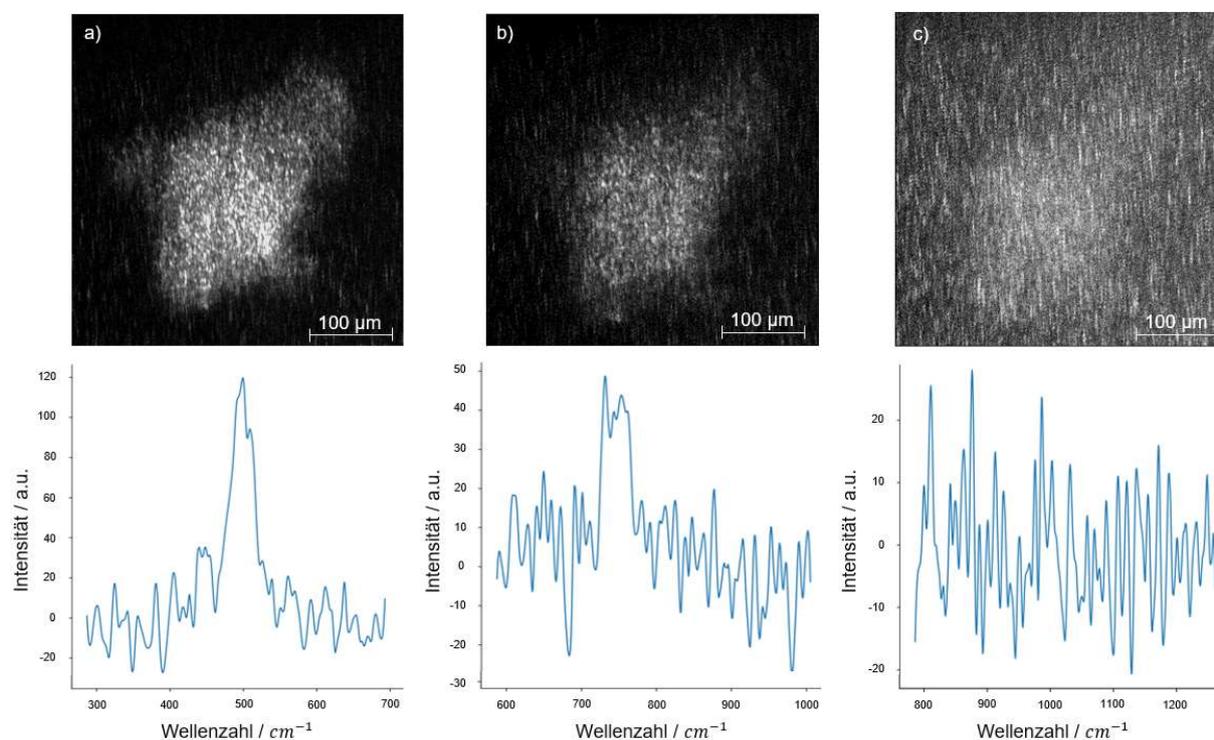


Abbildung 83: Ergebnisse der Messung von Fluoreszenz mit zugehörigem Spektrum bei bei 500, 750 und 1000 cm^{-1} mit Laser 1 (785 nm).

Bei der Fluoreszenz-Messung mit Laser 1 ist zu beobachten, dass die Bildinformationen mit zunehmenden Raman-Shift unschärfer und durch Störeffekte verdeckt werden. Die Spektren bestätigen diese Beobachtung, da das Signal von einem SNR von 6 bei 500 cm^{-1} auf ein SNR von unter 2 bei 1000 cm^{-1} abfällt. Ab einem bestimmten Raman-Shift ist kein Signal mehr erkennbar. Trotz des abnehmenden Signals bleibt jedoch die morphologische Struktur des Sphäroids in den Bildern erkennbar. Die unterschiedlich beleuchteten Bereiche des Sphäroids geben Aufschluss darüber, dass dort Zellorganellen vorhanden sind, die durch ihre Autofluoreszenz zum Leuchten gebracht werden. Die Unterschiede in der Helligkeit der verschiedenen Bereiche deuten auf unterschiedliche Zusammensetzungen oder Konzentrationen von fluoreszierenden Molekülen hin. Obwohl die Bildinformation und das Signal bei höheren Raman-Shifts abnehmen, liefern die Fluoreszenz-Bilder dennoch wichtige Informationen über die Zusammensetzung und Verteilung von fluoreszierenden Molekülen innerhalb des Sphäroids. Sie ergänzen somit die Rayleigh-Messungen und ermöglichen eine umfassendere Charakterisierung der Probe.

In den Messungen mit Laser 2 wird lediglich die Einstellung des AOTFs verändert, während alle anderen Parameter konstant bleiben. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 84 anschaulich dargestellt.

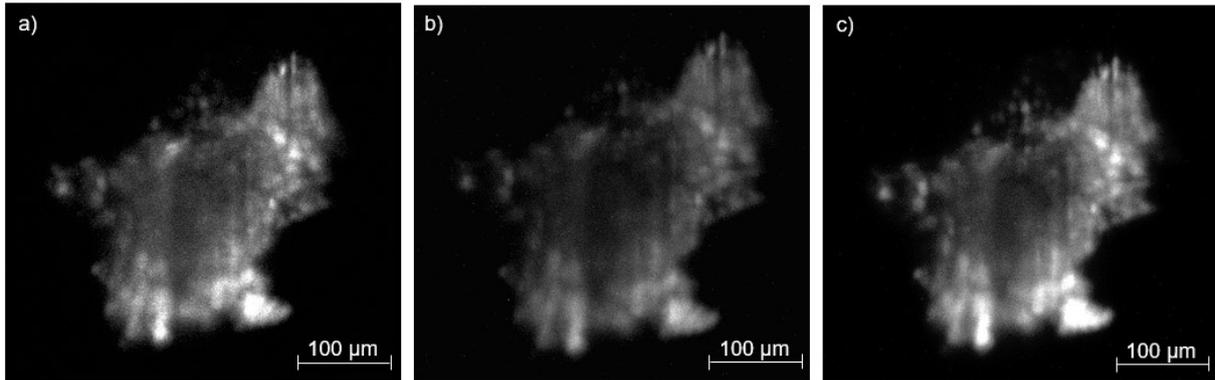


Abbildung 84: Darstellung von Fluoreszenz-Effekten mit zugehörigem Spektrum bei 500, 750 und 1000 cm^{-1} mit Laser 2 (660 nm).

Im Vergleich zu den Messungen mit Laser 1 liefern die Fluoreszenz-Messungen mit Laser 2 eindeutige Ergebnisse bezüglich der Morphologie und der Verteilung der Intensitäten innerhalb der Zellstruktur. Die morphologische Struktur der Sphäroide stimmt in allen drei Messungen mit derjenigen der Rayleigh-Konfiguration überein. In der ersten Messung (a) mit einem Raman-Shift von 500 cm^{-1} ist eine gleichmäßige Verteilung der Beleuchtung über das gesamte Sphäroid zu beobachten, wobei bestimmte Bereiche eine höhere Intensität aufweisen. Darüber hinaus sind einzelne Zellorganellen erkennbar, die durch lokale Abgrenzungen von anderen Bereichen gekennzeichnet sind. Bei der Messung (b) mit einem Raman-Shift von 750 cm^{-1} ist das Bild generell dunkler als bei Messung (a). Es sind deutliche Kontraste zwischen verschiedenen Bereichen erkennbar. Ähnlich wie zuvor sind auch hier einzelne Zellorganellen durch Abgrenzungen von ihrer Umgebung definiert. Das Bild erscheint jedoch unschärfer im Vergleich zu Messung (a). Zudem sind bestimmte Strukturen im oberen und linken Bereich nicht mehr sichtbar, was auf unterschiedliche Fluoreszenz-Marker und somit auf verschiedene molekulare Informationen hinweisen könnte. Das Bild (c) zeigt wiederum die Strukturen, die bereits in Bild (a) erkennbar sind. Die Verteilung der Intensitäten ist ungleichmäßiger und stärker ausgeprägt als in Bild (a). Darüber hinaus leuchten andere Bereiche heller auf. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängenbereichen der Autofluoreszenz verschiedene Molekülinformationen dargestellt werden können.

Um die Plausibilität der eingestellten Bereiche mit Laser 2 in Bezug auf Raman-Messungen zu überprüfen, wird eine vergleichbare Messung durchgeführt, die sowohl für die Fluoreszenzmessungen als auch für die Raman-Messungen relevant ist. Durch die Plausibilitätsmessung wird untersucht, ob die in den Bildern sichtbaren Strukturen und Intensitätsverteilungen tatsächlich mit den erwarteten spektralen Informationen übereinstimmen, obwohl keine spezifischen Spektren aufgenommen werden können. Dies bedeutet, dass anhand der Morphologie, der Helligkeitsverteilung und anderen visuellen Merkmalen der Bilder, die mit Laser 2 aufgenommen wurden, geprüft wird, ob sie mit den erwarteten Raman-Signalen und -

Eigenschaften übereinstimmen. Dabei wird angenommen, dass die Fluoreszenz- und Raman-Messungen ähnliche Informationen über die Zusammensetzung und Verteilung der Moleküle liefern. Diese Plausibilitätsmessung ermöglicht eine vorläufige Bewertung der Messergebnisse und dient als unterstützender Nachweis, dass die eingestellten Bereiche tatsächlich die gewünschten spektralen Informationen liefern, auch wenn keine spezifischen Spektren aufgenommen werden können.

3.3.3 Plausibilitätsmessung

Für den Nachweis von Raman-Signalen sind Spektren erforderlich. Aufgrund technischer Beschränkungen des LSRM können jedoch nur für Laser 1 vollständige Raman-Signale erfasst werden, während für Laser 2 Signale erst oberhalb einer Wellenzahl von 2700 cm^{-1} detektiert werden können. Um sicherzustellen, dass auch die detektierten Signale für Laser 2 unterhalb von 2700 cm^{-1} tatsächlich Raman-Signale sind, wird eine Plausibilitätsmessung durchgeführt. Hierzu wird ein Agarose-Block verwendet, in den ein elementares Schwefelteilchen eingebettet ist. Elementarer Schwefel besitzt kein intrinsisches Fluoreszenzsignal. Fluoreszenz tritt normalerweise bei Verbindungen auf, die bestimmte chemische Eigenschaften aufweisen und elektronische Übergänge durch Lichtabsorption und -emission ermöglichen. Bei elementarem Schwefel (S_8 -Moleküle) fehlen jedoch solche elektronischen Übergänge, die zur Fluoreszenz führen könnten.¹⁸² Allerdings ist bekannt, dass elementarer Schwefel Raman-Signale erzeugen kann. Schwefel weist charakteristische Raman-Signaturen auf, die zur Identifizierung und Analyse des Materials genutzt werden können. Daher dient das Schwefel-Spektrum als Referenz für die Plausibilitätsmessung. Das Spektrum des Schwefels zeigt spezifische Raman-Banden, die durch die Wechselwirkung von Laserlicht mit den Schwefelmolekülen entstehen. Durch den Vergleich der detektierten Signale unterhalb von 2700 cm^{-1} mit dem Schwefel-Spektrum kann überprüft werden, ob es sich tatsächlich um Raman-Signale handelt.

Die Abbildung 85 zeigt das Spektrum des elementaren Schwefels, gemessen mit dem Raman-Spektrometer MultiSpec®Raman (Tec5 AG, Deutschland), das die charakteristischen Raman-Banden verdeutlicht. Durch den erfolgreichen Nachweis von Raman-Signalen für Laser 2 unterhalb von 2700 cm^{-1} mithilfe der Plausibilitätsmessung wird bestätigt, dass auch für Laser 2 Raman-Signale erfasst und diese für weitere Analysen und genutzt werden können. Das Spektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm bei einer Lichtleistung von 500 mW und einer Integrationszeit von 100 ms aufgenommen.

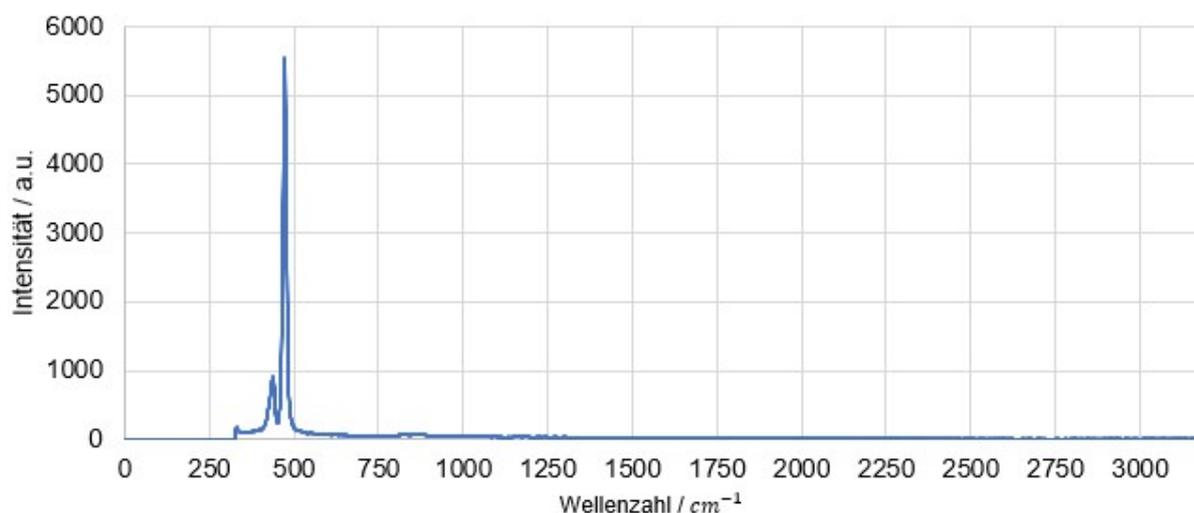


Abbildung 85: Raman-Spektrum von elementarem Schwefel, gemessen mit dem Tec5-Raman-Spektrometer bei einer Laserleistung von 500 mW und einer Integrationszeit von 100 ms.

Das Spektrum des elementaren Schwefels offenbart einen äußerst intensiven und deutlichen Raman-Peak bei 473 cm^{-1} . Dieser spezifische Peak ist charakteristisch für Schwefel und wird zur Identifikation und Analyse des Materials herangezogen. Obwohl Schwefel weitere Peaks aufweist, können diese aufgrund eines eingebauten Langpassfilters im Spektrometer nicht erfasst werden. Daher wird dieser spezielle Peak bei 473 cm^{-1} bei der Durchführung der Plausibilitätsmessung als Nachweis für Raman-Signale genutzt.

Die Wahl des Peaks bei 473 cm^{-1} basiert auf den technischen Einschränkungen, die durch die verwendeten Langpassfilter bedingt sind. Diese Filter lassen nur Licht mit einer Wellenzahl oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts passieren und filtern niedrigere Wellenzahlen aus. In diesem Fall werden die Peaks bei 153 und 220 cm^{-1} herausgefiltert und sind in den detektierten Signalen nicht sichtbar. Daher wird der Peak bei 473 cm^{-1} als verlässlicher Nachweis für Raman-Signale herangezogen, da er trotz der Filtereigenschaften deutlich sichtbar ist. Dieser Peak bestätigt die Raman-Aktivität des elementaren Schwefels und zeigt, dass auch für Laser 2 unterhalb von 2700 cm^{-1} Raman-Signale erfasst werden können. Somit wird die Plausibilität der Raman-Messungen für Laser 2 sichergestellt.

Die morphologische Struktur des Schwefelteilchens wurde im ersten Schritt mithilfe der Rayleigh-Konfiguration analysiert. Hierbei wurden die Laserleistung auf 1 mW eingestellt, um eine ausreichende Beleuchtungsintensität zu gewährleisten. Der AOTF wurde entsprechend auf die Anregungswellenlänge des jeweiligen Anregungslasers eingestellt. Zusätzlich wurde die Integrationszeit der Kamera auf 100 ms festgelegt, um eine angemessene Belichtungszeit zu erreichen. Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen sind in Abbildung 86 dargestellt.

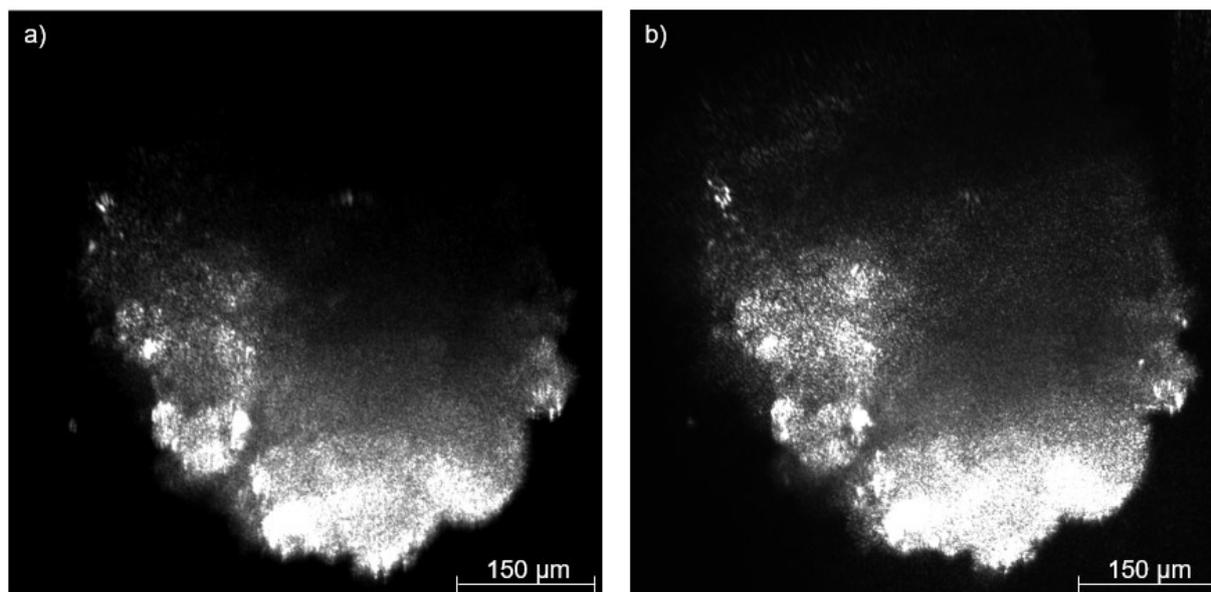


Abbildung 86: Aufnahme der Rayleigh-Strahlung von elementarem Schwefel mit a) Laser 2 bei 785 nm und b) Laser 2 bei 660 nm.

Die Bilder zeigen deutlich die morphologische Struktur des Schwefelteilchens. Die Anwendung von Laser 1 resultiert in einer raumgroben Strukturdarstellung, während Laser 2 die Möglichkeit bietet, hochauflösende und detaillierte Bilder zu generieren. In den Aufnahmen sind helle Bereiche zu sehen, die auf eine höhere Intensität des Streulichts zurückzuführen sind, während dunklere Bereiche geringere Intensitäten aufweisen. Die erhaltenen Bilder bieten erste Erkenntnisse über die strukturellen Eigenschaften des Schwefelteilchens. Anhand der Kontraste und Helligkeitsunterschiede lassen sich unterschiedliche Bereiche und Merkmale identifizieren. Die grobe Struktur, die durch Laser 1 sichtbar wird, gibt einen Überblick über die Gesamtform und -größe des Teilchens. Durch die Verwendung von Laser 2 werden feinere Details und subtile Strukturen sichtbar, die einen besseren Vergleich mit den Raman-Bildern ermöglichen.

Diese Raman-Bilder werden mit der Raman-Konfiguration aufgenommen.

In der Raman-Konfiguration werden die Laserleistungen gemäß den Spezifikationen festgelegt, wobei Laser 1 auf 200 mW und Laser 2 auf 130 mW eingestellt werden. Der AOTF wird entsprechend der Anregungswellenlänge auf einen Raman-Shift von 473 cm^{-1} abgestimmt, um die erforderliche spektrale Information zu erfassen. Die Integrationszeit für beide Messungen beträgt 5000 ms, um ausreichend statistische Signale zu erfassen. Zusätzlich wird bei der Raman-Messung mit Laser 1 ein Spektrum aufgenommen, als Nachweis für den Schwefel-Raman-Peak, bei dem sich die Integrationszeit auf 20 s beläuft. Abbildung 87 zeigt die Ergebnisse der Messung.

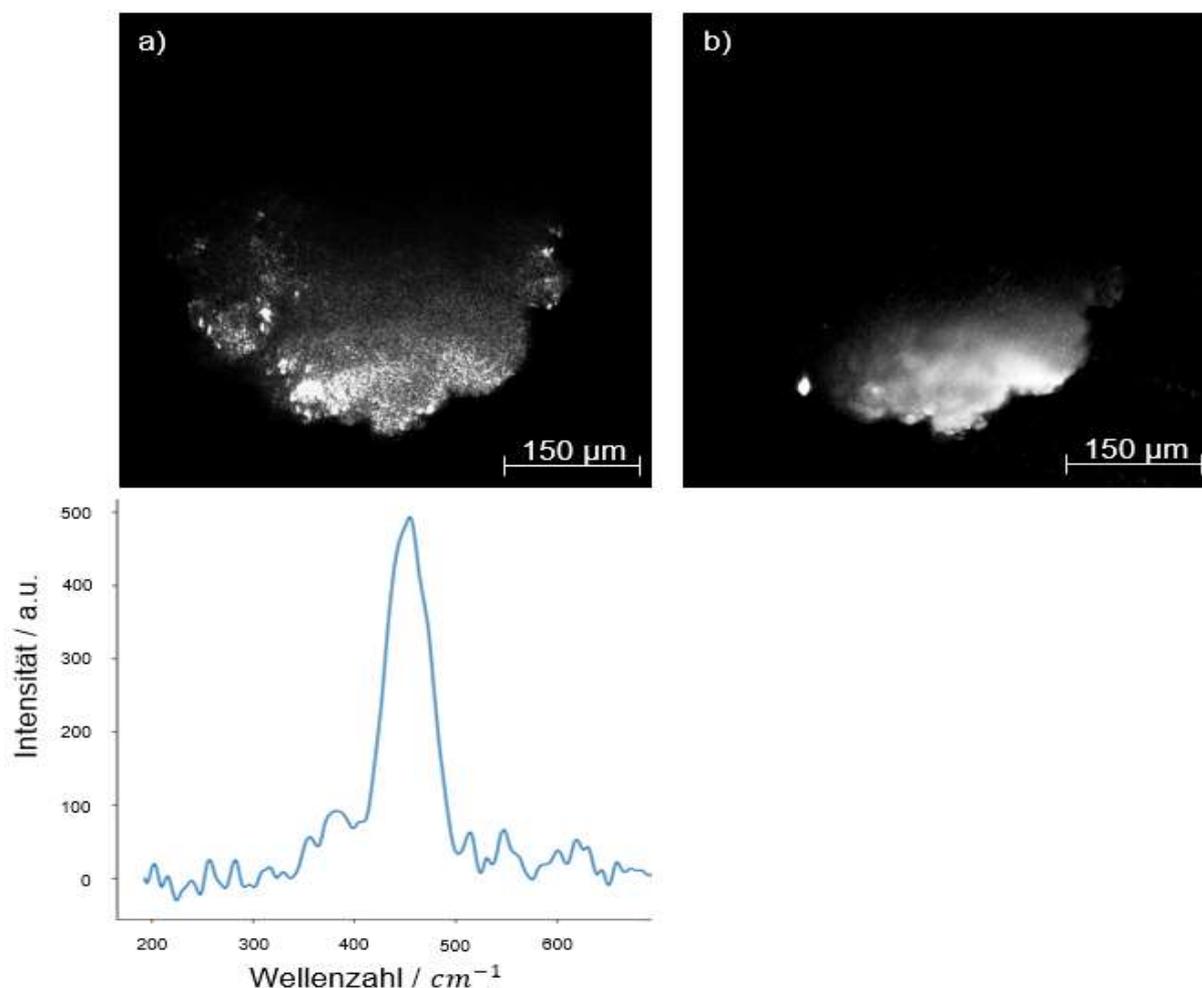


Abbildung 87: Ergebnisse der Messung von elementarem Schwefel bei a) 785 nm mit zugehörigem Spektrum und b) 660 nm.

Die Ergebnisse der Raman-Messung verdeutlichen, dass das Spektrum im gesamten untersuchten Spektralbereich von 0 bis 3300 cm^{-1} lediglich einen einzigen Peak aufweist. Dieser Peak tritt bei 473 cm^{-1} auf und kann zweifelsfrei dem Schwefelspektrum zugeordnet werden. Aus diesem Befund geht hervor, dass Bild a), das mit Laser 1 aufgenommen wurde, ausschließlich Raman-Signale darstellt. Zudem weist das Bild eine ähnliche Struktur wie die Rayleigh-Bilder auf, jedoch mit einem höheren Detailgrad, was mit der Raman-Messung in Einklang steht, da diese detailliertere Informationen liefert. In Bild b), das mit Laser 2 aufgenommen wurde, sind ebenfalls die gleichen Strukturen erkennbar wie auf den Rayleigh-Bildern und dem Raman-Bild von Laser 1. Da dieselben Einstellungen verwendet wurden, die zur Erzeugung des Raman-Bildes 1 geführt haben, lässt sich daraus schließen, dass auch dieses Bild das Raman-Signal des Schwefels darstellt. Obwohl kein Spektrum den direkten Nachweis liefert, ermöglicht die Plausibilität der Messungen diese Schlussfolgerung.

Es ist nicht überraschend, dass das Bild mit Laser 2 heller und detaillierter ist, da die Intensität des Raman-Signals mit der vierten Potenz bei abnehmenden Anregungswellenlängen zunimmt. Dieser Vergleich liefert den Nachweis, dass Raman-Bilder auch mit Laser 2 erzeugt

werden können, sofern die entsprechenden Konfigurationen verwendet werden, selbst wenn kein Spektrum direkt darauf hinweist. Die Möglichkeit wird durch die Plausibilität der Messungen bestätigt.

3.3.4 Raman-Konfiguration

Für die Raman-Messung des HT29-Fibroblasten-Sphäroids wird die Raman-Konfiguration verwendet. Dabei wird besonderes Augenmerk auf die Molekülverbindung C-H gelegt, und es werden zwei für diese Verbindung charakteristische Bereiche untersucht. In der ersten Messung liegt der Fokus auf dem C-H-Streck-Bereich zwischen 2800 und 2950 cm^{-1} . Die Ergebnisse dieser Messung werden in Abbildung 88 dargestellt. Die Laserleistung beträgt hier 200 mW (Laser 1) bzw. 130 mW (Laser 2). Der AOTF ist unter Berücksichtigung der Bandbreite auf den entsprechenden Raman-shift von 2900 cm^{-1} eingestellt. Die Integrationszeit beträgt 5000 ms . Die Integrationszeit der Spektren beträgt 20 s .

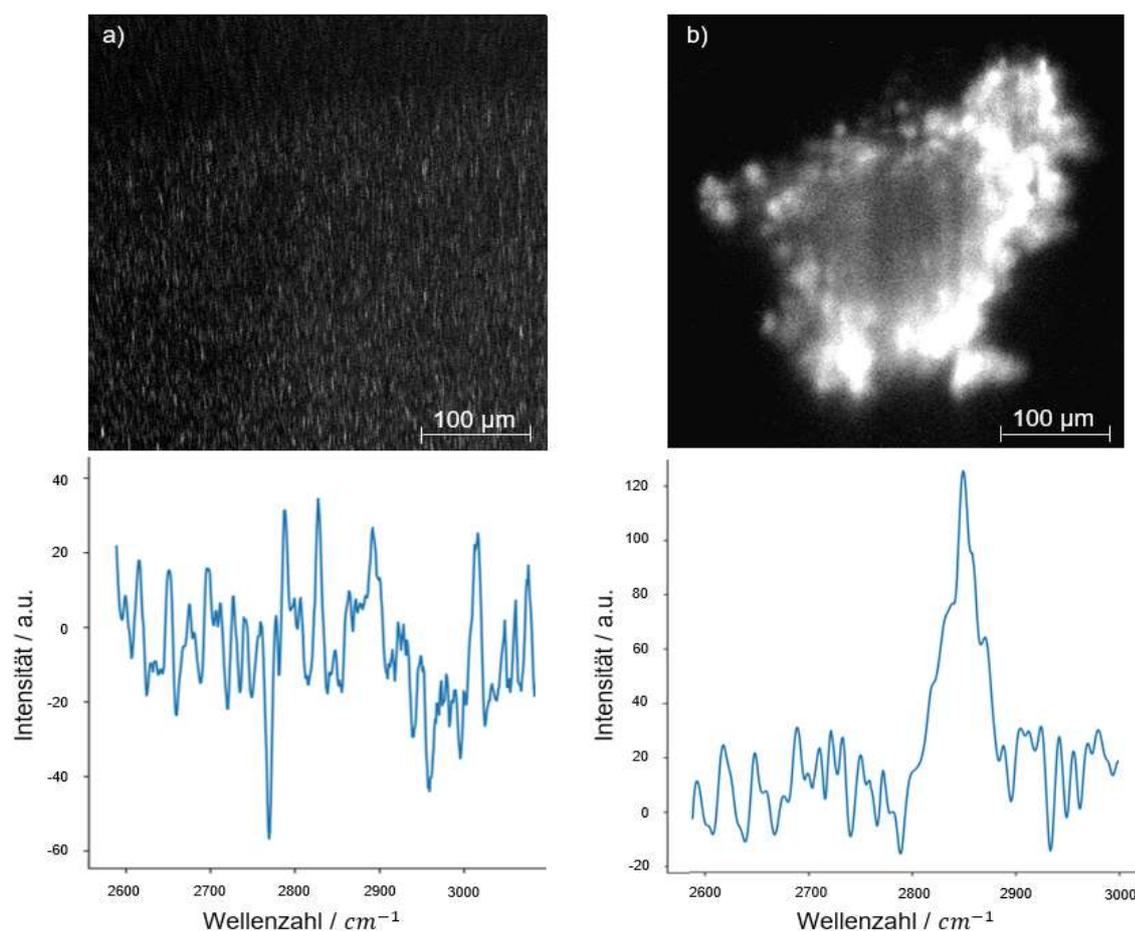


Abbildung 88: Ergebnisse der Messung vom Raman-Signalen mit zugehörigem Spektrum bei 2900 cm^{-1} bei a) 785 nm und b) 660 nm .

Die Raman-Messung mit Laser 1 ergab ein unscharfes Bild, welches aufgrund technischer Einschränkungen keine eindeutige Interpretation zulässt. Im eingestellten Bereich ist ein Plateau zu erkennen, welches jedoch nicht als Nachweis dienen kann, da kein Signal mit

einem SNR von mehr als 2 vorliegt. Diese Herausforderungen lassen sich auf verschiedene Faktoren zurückführen. Zum einen befindet sich der Raman-Shift von 2900 cm^{-1} , bezogen auf die Anregungswellenlänge von 785 nm, im Bereich um 1017 nm, der sich am äußersten Rand der Transmissionsfähigkeit des AOTF befindet. In diesem Bereich ist die Durchlassfähigkeit des AOTF stark eingeschränkt. Resultierend daraus ist eine Verringerung der übertragenen Lichtintensität. Zum anderen liegt die Quanteneffizienz der verwendeten Kamera bei dieser spezifischen Wellenlänge unter 10%, was darauf hindeutet, dass die Empfindlichkeit der Kamera für das detektierte Lichtsignal begrenzt ist. Unter Berücksichtigung dieser technischen Einschränkungen ist es daher nicht möglich, mit der Konfiguration Laser 1 ein aussagekräftiges Raman-Bild der gewünschten Probe im Bereich von 2900 cm^{-1} zu erzeugen. Das beobachtete unscharfe Bild und das schwache Signal im Spektrum sind das Resultat dieser Limitierungen des Systems.

Mit Laser 2 hingegen lässt sich ein deutlich aussagekräftiges Raman-Bild erzeugen. Der Raman-Shift von 2900 cm^{-1} , bezogen auf die Anregungswellenlänge von 660 nm, liegt bei einer Wellenlänge von 817 nm und ermöglicht eine gute Detektion der entsprechenden Wellenlänge, auch mit dem Spektrometer. Es zeigt sich ein eindeutiges Spektrum mit einem SNR von mehr als 6, was auf eine hohe Signalqualität hinweist. Im Vergleich zum Rayleigh-Bild liefert das Raman-Bild eine detaillierte Strukturverteilung innerhalb des Fibroblasten-Sphäroids. Es ermöglicht eine eindeutige Unterscheidung einzelner Bereiche, insbesondere des bereits im Rayleigh- und Fluoreszenz-Bereich erkennbaren Sphäroid-Kerns, der hier noch deutlicher hervorgehoben wird. Bereiche mit hohen Intensitäten deuten auf eine erhöhte Anzahl von C-H-Verbindungen hin, was wiederum Rückschlüsse auf spezifische Organellen wie Zellkerne zulässt. Zellkerne enthalten viel Kollagen, das viele C-H-Verbindungen aufweist. Im Raman-Bild ist eine markante asymmetrische Helligkeitsverteilung zu erkennen, was im Gegensatz zu den bekannten Rayleigh-Aufnahmen steht, die eine gleichmäßigere Helligkeitsverteilung aufweisen. Die dem einfallenden Beleuchtungslicht zugewandte Seite des Sphäroids (rechts) weist eine signifikant höhere Helligkeit im Vergleich zur gegenüberliegenden Seite auf. Dieses Phänomen resultiert aus der Abschwächung des Lichts während der Durchdringung des Gewebes. Die Auflösung des Raman-Bildes ist ähnlich wie bei der Fluoreszenz-Messung geringer im Vergleich zur Rayleigh-Messung. Dies ist auf Streueffekte innerhalb der Probe sowie auf die niedrigere Signalintensität zurückzuführen.

Die Raman-Messung im Bereich um 1500 cm^{-1} stellt eine weitere Konfiguration des Systems dar, bei der die C-H-Verbindung in einer anderen Schwingungsform untersucht wird, nämlich in Form von Biegeschwingungen. In dieser Messung wurden die Laser mit einer maximalen Leistung von 200 mW (Laser 1) bzw. 130 mW (Laser 2) betrieben, und die Integrationszeit betrug 5000 ms. Die Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 20 s aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 89 dargestellt.

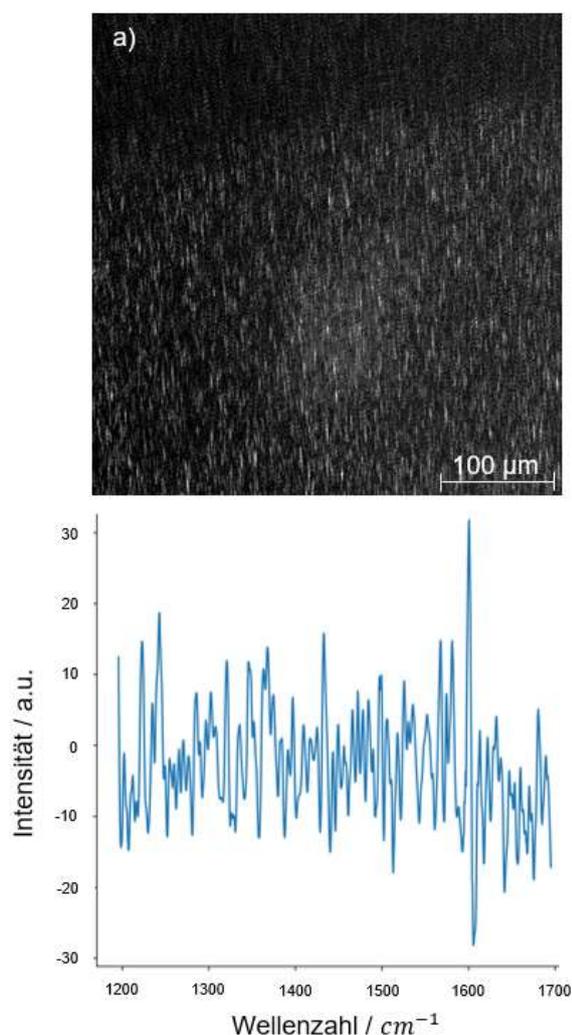


Abbildung 89: Ergebnisse der Messung vom Raman-Signalen bei 1500 cm^{-1} bei a) 785 nm mit zugehörigem Spektrum und b) 660 nm .

Bei der Raman-Messung im Bereich um 1500 cm^{-1} ergibt sich eine ähnliche Beobachtung wie bei der Messung mit einer Wellenzahl von 2900 cm^{-1} . Mit Laser 1 wird nur ein verwaschenes Bild erzeugt, und es ist lediglich im zentralen Bereich des Sphäroids ein schwaches Signal erkennbar. Jedoch kann dieses Signal mangels Sensitivität nicht mit dem Spektrometer nachgewiesen werden. Obwohl die Quanteneffizienz auf 25% gestiegen ist und die Transmission des AOTFs verbessert wurde, reicht dies nicht aus, um aussagekräftige Signale zu erzeugen.

Im Gegensatz dazu liefert die Raman-Messung mit Laser 2 wiederum ein deutlich erkennbares Bild. Im Vergleich zu den Rayleigh-Bildern ist auch hier die typische Form des Sphäroids erkennbar mit einer verbesserten Auflösung der einzelnen Bestandteile. Obwohl kein Spektrum aufgenommen werden kann, lässt sich aufgrund der Plausibilität annehmen, dass die Signale auf dem Bild durch den Raman-Effekt entstehen. Der Raman-Peak bei 1500 cm^{-1} liegt weit genug entfernt von der Fluoreszenzbande, sodass die Fluoreszenz nur einen minimalen Einfluss auf die Signalstärke der Raman-Messung hat. Im Raman-Bild selbst ist die

charakteristische Sphäroid-Struktur erkennbar. Es scheint eine Abgrenzung zum mittleren Teil des Sphäroids durch eine Phasengrenze zu geben. Im Vergleich zur Messung bei 2900 cm^{-1} sind verschiedene Bereiche des Sphäroids hell erleuchtet, was auf eine unterschiedliche Konzentrationsverteilung von C-H-Verbindungen hinweisen könnte. Die asymmetrische Ausleuchtung, wie bereits in der vorherigen Messung beobachtet, ist auch hier erkennbar. Die Einzelbilder und Schnitte der verschiedenen Mess-Konfigurationen liefern wertvolle Informationen über die Molekülverteilungen innerhalb des Sphäroids. Jedoch geben sie nur begrenzte Auskunft über die räumliche Anordnung der Moleküle. Um ein umfassenderes Verständnis der räumlichen Verteilung zu erhalten, ist es notwendig, ein 3D-Bild der aufgenommenen Bilder zu erstellen.

3.4 Darstellung der Resultate im 3D-Modell

Durch die Kombination der einzelnen Schichten des Sphäroids in einem dreidimensionalen Stapel wird eine volumetrische Repräsentation der Probe generiert. Dies ermöglicht eine verbesserte visuelle Erfassung der räumlichen Anordnung der Moleküle innerhalb des Sphäroids. Es eröffnet die Möglichkeit, Verteilungsmuster in verschiedenen Tiefen des Sphäroids zu analysieren und potenzielle Gradienten oder Cluster zu identifizieren. Die dreidimensionale Darstellung bietet zudem die Möglichkeit, verschiedene Perspektiven und Ansichten des Sphäroids zu betrachten, wodurch eine detaillierte Strukturanalyse und Molekülverteilungsuntersuchung ermöglicht wird. Sie erlaubt auch die Extraktion von quantitativen Informationen wie dem Volumen, der Oberfläche oder der Dichte der Molekülverteilung in unterschiedlichen Regionen des Sphäroids.

Zur Visualisierung der 3D-Modelle werden Überlagerungen (Stacks) aus verschiedenen Objektinformationen des LSRM verwendet, nämlich Rayleigh, Fluoreszenz und Raman. Diese Stacks werden in verschiedenen Perspektiven dreidimensional dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde jeweils eine Aufnahme mit Laser 2 ausgewählt. Eine Aufschlüsselung der einzelnen Parameter der ausgewählten Bilder ist in Tabelle 16 zu finden.

Tabelle 16: Übersicht der einzelnen Messparameter zur Bestimmung der Spektrometer-Stabilität.

Nr.	Konfiguration	Anregungswellenlänge	Detektionsbereich
1	Rayleigh	660 nm	660 nm / 0 cm^{-1}
2	Fluoreszenz	660 nm	683 nm / 500 cm^{-1}
3	Raman	660 nm	817 nm / 2900 cm^{-1}

Die Aufnahmen des 660 nm Lasers wurden gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Messbilder zu gewährleisten. Zusätzlich weisen diese Bilder eine höhere Kantenauflösung auf.

Hinzu kommt die Auswahl einer grünen Colormap zum virtuellen Einfärben der 3D-Modelle. Dies ist darin begründet, dass grün für die visuellen Wahrnehmungen des Menschen besonders gut geeignet ist.¹⁸³ Der grüne Wellenlängenbereich liegt in der Nähe des maximalen Ansprechvermögens der Augen. Dadurch können feinere Strukturen besser erkannt werden. Ebenso kann eine grüne Colormap dazu beitragen, Verzerrungen zu minimieren. Andere Farben, wie beispielsweise rot oder blau, können häufig zu starken Kontrasten führen, die bestimmte Details überbetonen oder verschleiern können. Die Verwendung einer grünen Colormap ist in vielen Anwendungsbereichen bereits etabliert, wie beispielsweise in der medizinischen Bildgebung oder der Darstellung topografischer Karten.

Im ersten Schritt erfolgt die Erstellung einer dreidimensionalen Abbildung mittels der Rayleigh-Konfiguration. Durch die Verwendung mehrerer Perspektiven wird eine umfassende und detaillierte Darstellung ermöglicht, die wichtige Informationen über die Struktur liefert. Das erzeugte dreidimensionale Modell zeigt die räumliche Verteilung und die Form der betrachteten Objekte. Abbildung 90 veranschaulicht das resultierende Modell und dient als visuelle Referenz für weitere Analysen und Interpretationen.

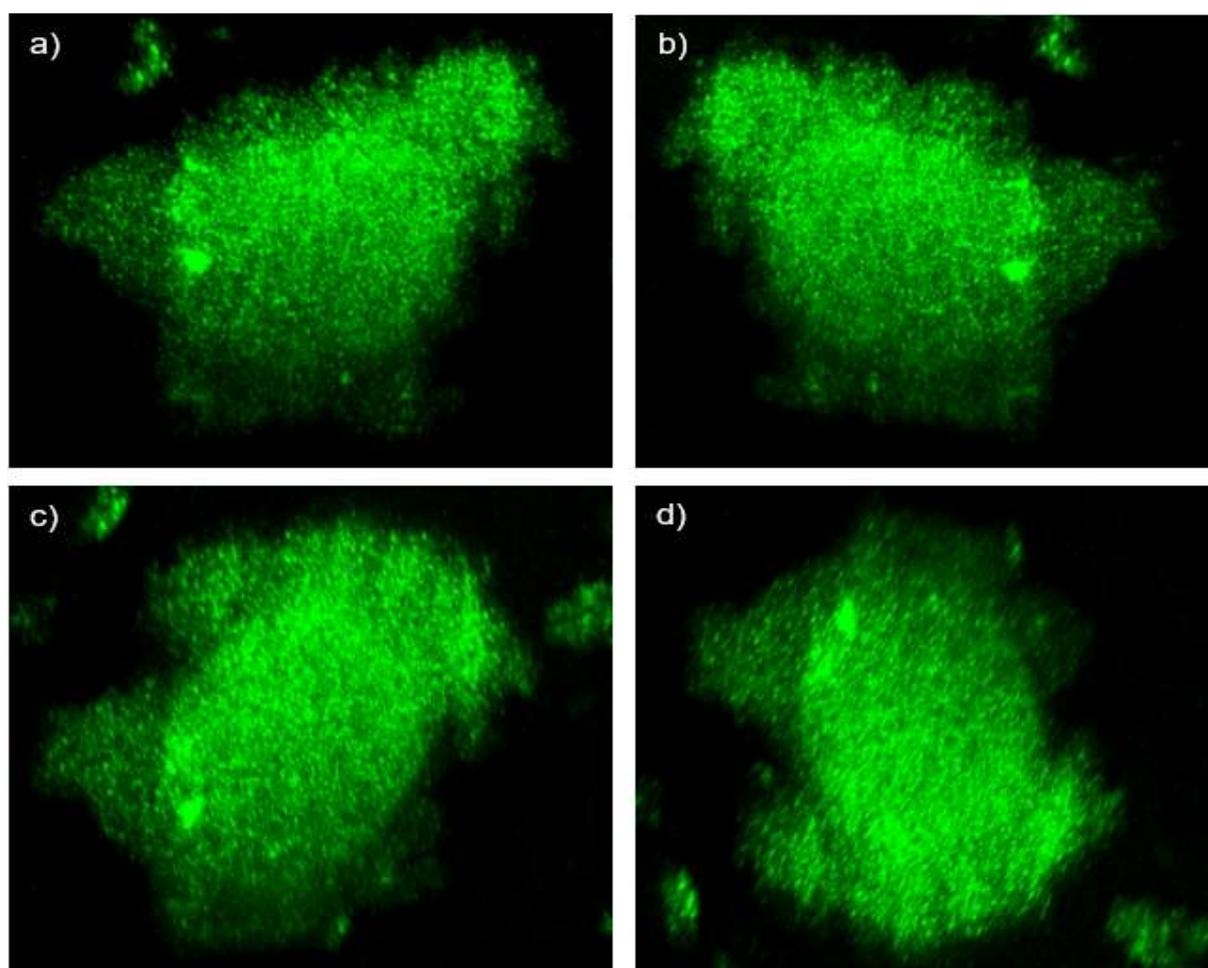


Abbildung 90: 3D-Darstellung des Rayleigh-Stacks eines HT29-Fibroblasten-Sphäroids in der a) Frontansicht, b) Rückansicht, c) Draufsicht und d) Untersicht. Die Aufnahme besteht aus 52 Einzelbildern. Anregungswellenlänge: 660 nm, Lichtleistung: 1 mW, AOTF-Einstellungen: 660 nm, Integrationszeit: 100 ms.

Die 3D-Aufnahmen in der Rayleigh-Konfiguration offenbaren bedeutende Erkenntnisse bezüglich der geometrischen Dimensionen des Sphäroids. Es wird deutlich, dass die Probe eine asymmetrische Struktur besitzt, bei der keine symmetrische Anordnung der Zellen vorliegt. Darüber hinaus sind außerhalb des Sphäroids Artefakte zu erkennen, die auf Rückstände von Agarose oder Lufteinschlüsse während des Herstellungsprozesses im Agaroseblock zurückzuführen sind. Diese Artefakte beeinflussen jedoch nicht die Bewertung der Zellbeschaffenheit und können daher vernachlässigt werden. Das Sphäroid selbst zeigt keinerlei Anzeichen einer Beschädigung durch den Präparationsprozess und bleibt intakt. Neben den geometrischen Dimensionen liefert die Rayleigh-Konfiguration auch erste Hinweise auf physiologische Unterschiede innerhalb des Sphäroids. Obwohl keine einzelnen Zellen oder zellulären Bestandteile sichtbar sind, kann ein Kern identifiziert werden, der eine höhere Intensität aufweist und sich durch eine Grenzschicht von den äußeren Bereichen abgrenzt. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es Unterschiede in der physiologischen Aktivität oder in der Konzentration bestimmter Moleküle zwischen dem Kern und den äußeren Bereichen des Sphäroids gibt. Die Identifizierung dieser Unterschiede liefert erste Einblicke in die Heterogenität der Zellpopulation innerhalb des Sphäroids.

Die Ergebnisse der Rayleigh-Konfiguration zeigen, dass diese Methode zur Beurteilung der Qualität der Proben geeignet ist. Sie ermöglicht es, wichtige Informationen über die strukturellen Eigenschaften des Sphäroids zu gewinnen und erste Hinweise auf physiologische Unterschiede innerhalb des Gewebes zu erhalten. Darüber hinaus können die gewonnenen Erkenntnisse als Landmarks dienen, um die Analyse in anderen Konfigurationen weiterzuführen. Die Rayleigh-Konfiguration bietet somit eine solide Grundlage für die weitere Untersuchung und umfassende Charakterisierung der Sphäroide in verschiedenen Messkonfigurationen.

Für die Darstellung der Fluoreszenz-Bilder wurde gezielt die Wellenlänge von 500 nm^{-1} ausgewählt, da bei dieser spezifischen Wellenlänge das Autofluoreszenz-Signal im Vergleich zu den anderen einstellbaren Konfigurationen des LSM den höchsten Wert erreicht. Dies ermöglicht eine verbesserte Erfassung und Visualisierung der fluoreszierenden Strukturen. Die Abbildung 91 präsentiert die Fluoreszenz-Bilder aus verschiedenen Blickwinkeln, um eine umfassende Darstellung der räumlichen Verteilung der fluoreszierenden Signale zu ermöglichen. Die unterschiedlichen Perspektiven erlauben es, wichtige Informationen über die Form, die Intensität und die Verteilung der Fluoreszenz zu erfassen.

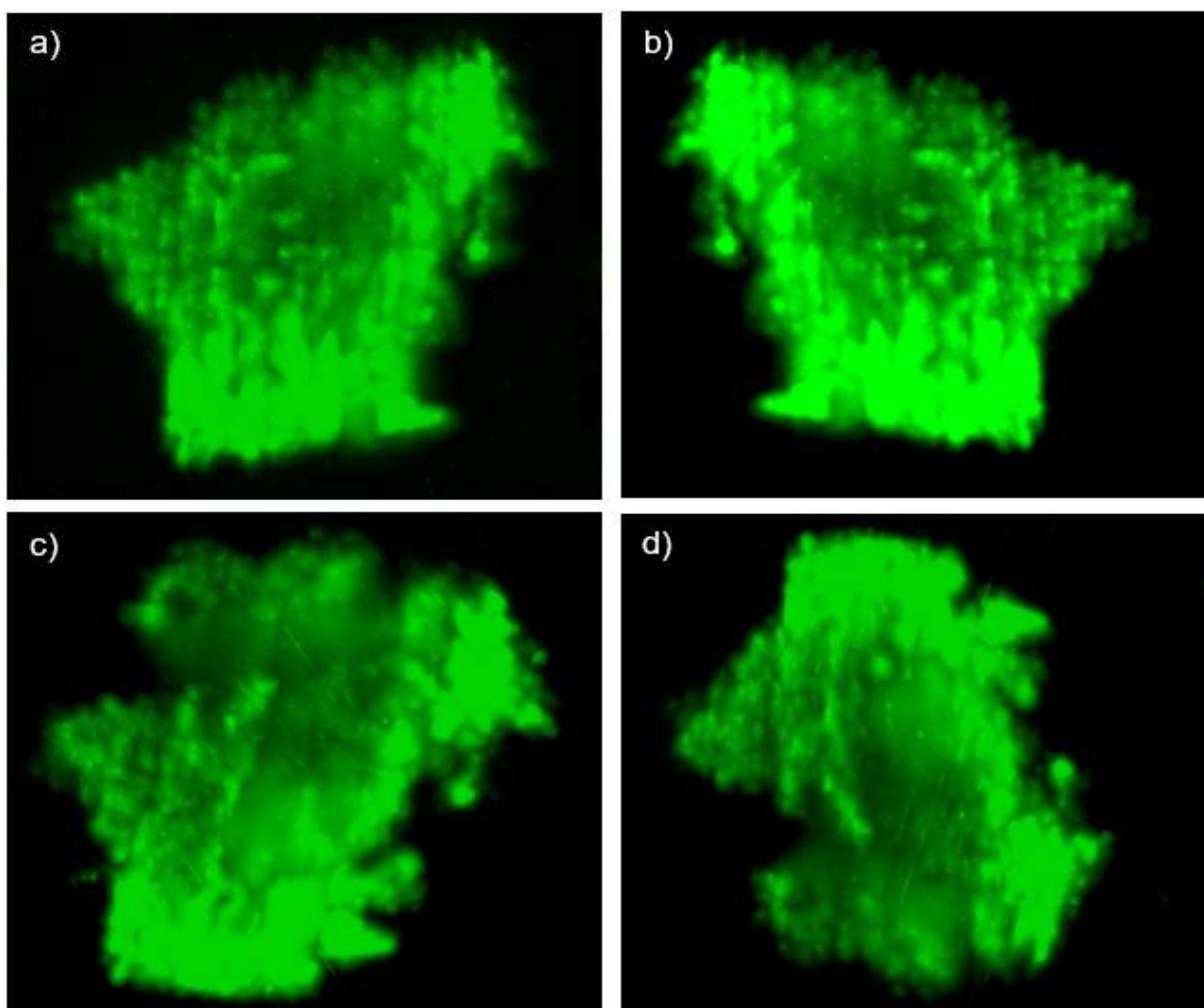


Abbildung 91: 3D-Darstellung des Fluoreszenz-Stacks eines HT29-Fibroblasten-Sphäroids in der a) Frontansicht, b) Rückansicht, c) Draufsicht und d) Untersicht. Die Aufnahme besteht aus 52 Einzelbildern. Anregungswellenlänge: 660 nm, Lichtleistung: 130 mW, AOTF-Einstellungen: 683 nm / 500 cm^{-1} , Integrationszeit: 5000 ms.

In der Fluoreszenz-Konfiguration zeigt sich der signifikanteste Unterschied im Vergleich zur Rayleigh-Konfiguration durch teilweise verwischte Konturen. Während die geometrische Form des Sphäroids noch erkennbar ist, zeichnen sich die Kanten durch eine gewisse Unschärfe aus, die auf die hohe Streuung der Fluoreszenz zurückzuführen ist. Diese Streuung führt zu einer diffusen und unscharfen Darstellung, die es erschwert, klare Konturen zu identifizieren. Nichtsdestotrotz lassen sich vereinzelt Zellen, insbesondere in den äußeren Bereichen, ausmachen. Diese Erscheinung ist teilweise auf die begrenzte Eindringtiefe des Laserlichts zurückzuführen. Mit zunehmender Dicke des Sphäroids kann das Laserlicht die inneren Bereiche nicht vollständig beleuchten. Dennoch eröffnet das dreidimensionale Modell detaillierte Einblicke in die äußeren Bereiche des Sphäroids.

Im Gegensatz zur Rayleigh-Konfiguration ist der zuvor erkennbare Kern im Fluoreszenz-Modell nicht eindeutig detektierbar. Allerdings fällt auf, dass eine Seite des Sphäroids deutlich höhere Intensitäten aufweist als die andere. Diese Asymmetrie lässt sich auf die Ausrichtung und Beleuchtungsrichtung des Lasers zurückführen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine

ungleichmäßige Verteilung fluoreszierender Moleküle innerhalb des Sphäroids. Obwohl der Kern nicht klar abgegrenzt ist, eröffnet die Fluoreszenz-Konfiguration dennoch die Möglichkeit, Zellen innerhalb des Sphäroids zu lokalisieren und zu charakterisieren.

Die Beobachtungen in der Fluoreszenz-Konfiguration ergänzen und erweitern somit die bisherigen Erkenntnisse aus den Rayleigh-Messungen. Sie tragen dazu bei, ein detailliertes Bild der Zusammensetzung des Sphäroids zu zeichnen. Durch die Integration von Informationen zur räumlichen Verteilung der Fluoreszenz und zur Anordnung der Zellen bieten diese Ergebnisse eine umfassendere Charakterisierung und Bewertung des Sphäroids.

Die unscharfen Kanten in der Fluoreszenz-Darstellung sind ein direktes Ergebnis der hohen Streuung der Fluoreszenzlicht-Photonen innerhalb des Sphäroids. Dieser Prozess führt zu einer diffusen Ausbreitung des Lichts und einer unscharfen Grenze zwischen dem Sphäroid und seiner Umgebung. Die Streuungseffekte können auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, wie z.B. die unterschiedlichen Reflexionseigenschaften der Oberfläche des Sphäroids. Diese Streuungseffekte beeinflussen die Bildqualität und erschweren die eindeutige Identifizierung der Konturen des Sphäroids. Die begrenzte Eindringtiefe des Laserlichts in das Sphäroid führt zu einer ungleichmäßigen Beleuchtung der inneren Bereiche. Mit zunehmender Dicke des Sphäroids wird das Laserlicht stärker absorbiert und erreicht die tieferen Schichten des Gewebes nicht mehr vollständig. Dies führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz-Intensität und der Sichtbarkeit der inneren Strukturen. Daher sind insbesondere die äußeren Bereiche des Sphäroids detailliert erkennbar, während die inneren Bereiche weniger gut aufgelöst sind. Diese Tatsache erschwert die genaue Charakterisierung des Sphäroids und die Analyse seiner inneren Struktur. In Bezug auf den zuvor erkennbaren Kern ist festzustellen, dass er im Fluoreszenz-Modell nicht eindeutig detektierbar ist. Dies könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Zum einen kann die Verteilung der Fluoreszenz-Marker innerhalb des Sphäroids heterogen sein, sodass der Kern keine eindeutig höhere Fluoreszenzintensität aufweist. Zum anderen können auch Streuungs- und Absorptionseffekte dazu beitragen, dass der Kern in der Fluoreszenz-Darstellung weniger deutlich erkennbar ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fluoreszenz-Konfiguration wertvolle Informationen zur Lokalisierung von Zellen innerhalb des Sphäroids liefert und die bisherigen Erkenntnisse aus den Rayleigh-Messungen ergänzt. Trotz der teilweise verwaschenen Konturen und der unscharfen Kanten ermöglicht sie eine detailliertere Analyse der äußeren Bereiche des Sphäroids. Die Fluoreszenzintensitäten können Hinweise auf physiologische Unterschiede und mögliche Heterogenitäten innerhalb des Sphäroids liefern.

Abschließend wird das 3D-Modell in der Raman-Konfiguration präsentiert, welche die schwächsten Signale aller betrachteten Konfigurationen aufweist. In dieser Konfiguration werden Raman-Spektren aufgenommen, um spezifische Informationen über die molekulare

Zusammensetzung der Proben zu erhalten. Das 3D-Modell, das durch die Raman-Messungen erzeugt wurde, liefert wichtige Einblicke in die räumliche Verteilung der Raman-Signale und ermöglicht die Identifizierung und Charakterisierung verschiedener chemischer Komponenten. In Abbildung 92 ist das Raman-3D-Modell der Zellkultur dargestellt.

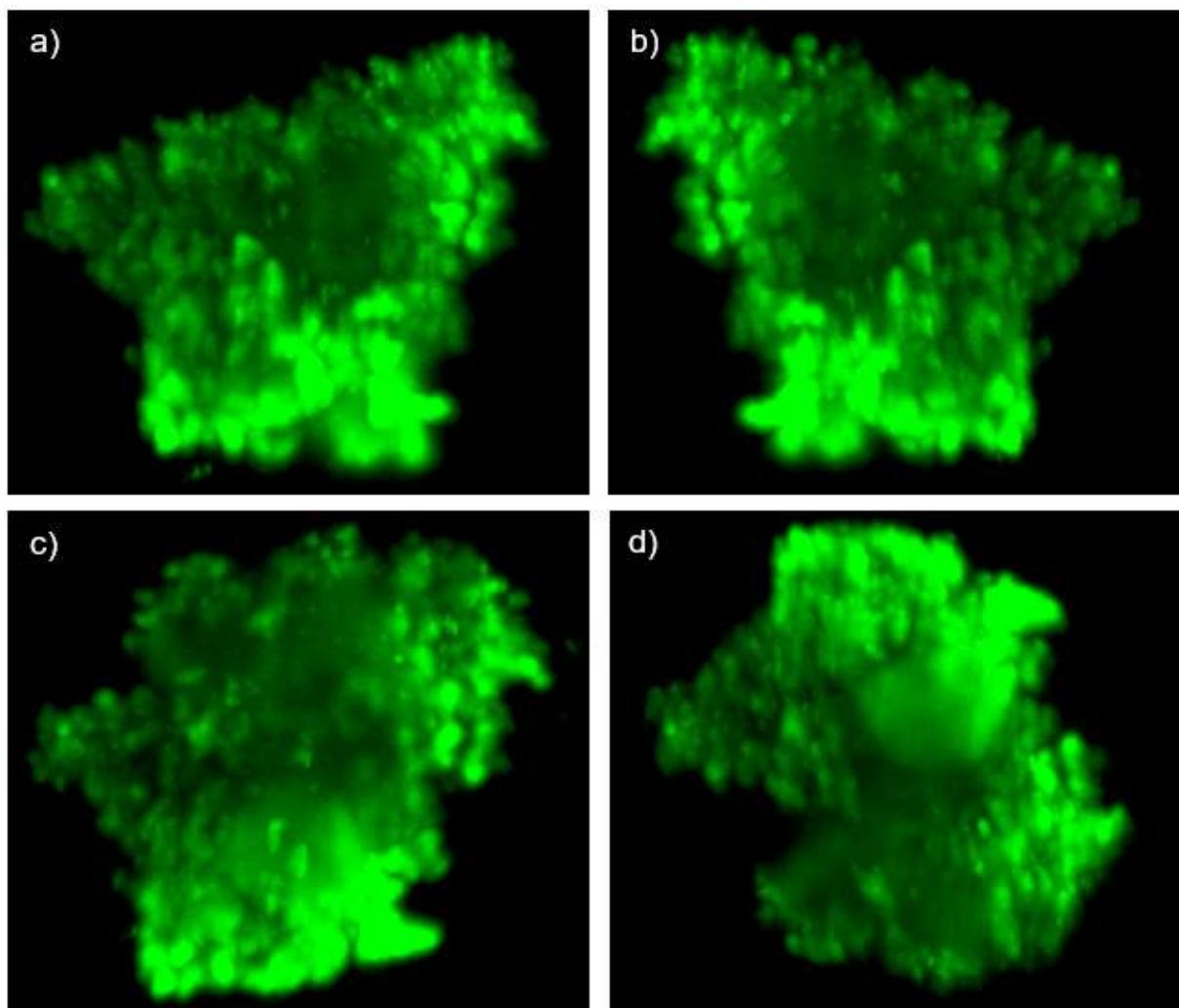


Abbildung 92: 3D-Darstellung des Raman-Stacks eines HT29-Fibroblasten-Sphäroids in der a) Frontansicht, b) Rückansicht, c) Draufsicht und d) Untersicht. Die Aufnahme besteht aus 52 Einzelbildern. Anregungswellenlänge: 660 nm, Lichtleistung: 130 mW, AOTF-Einstellungen: 817 nm / 2900 cm^{-1} , Integrationszeit: 5000 ms.

Die Raman-Bilder weisen tatsächlich eine niedrigere Intensität auf als andere Bildgebungsmethoden, hauptsächlich aufgrund des schwachen Raman-Effekts. Die Bilder können daher verwaschen wirken, insbesondere an den Rändern des Sphäroids, ähnlich wie bei der Fluoreszenz-Bildgebung. Trotz der niedrigen Intensität sind in den Raman-Bildern deutliche Strukturen bei der Darstellung der C-H-Streckbiegung erkennbar. Die Form des Sphäroids kann mit der Rayleigh-Aufnahme verglichen werden, wodurch sich eindeutige Eckpunkte adäquat zuordnen lassen. Innerhalb des Sphäroids können ebenfalls Strukturen und Zellbestandteile identifiziert werden.

Ein wichtiger Vorteil der Raman-Bildgebung im Vergleich zur Fluoreszenz-Bildgebung ist die bessere Ortsauflösung. Die Ortsauflösung in Raman-Bildern wird hauptsächlich durch die Fokussierung des Lasers und die Detektion des gestreuten Lichts bestimmt. Die letztlich die Auflösung bestimmende Beugungsgrenze wird gemäß dem Rayleigh-Kriterium festgelegt und beträgt typischerweise etwa die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts. Die Raman-Messung ermöglicht die Detektion genau spezifizierter Molekülinformationen im Gegensatz zur Fluoreszenz-Messung. Da die Molekülkonzentration in der Probe lokal unterschiedlich ist, weisen die Raman-Bilder trotz identischer Lokalität unterschiedliche geometrische Formen bei den Strukturinformationen auf. Die äußeren Bereiche werden oft detaillierter dargestellt als das Innere des Sphäroids. Die Form des Kerns kann anhand der äußeren Zellen identifiziert werden, ähnlich wie bei der Rayleigh-Konfiguration. Aufgrund der diffusen Streuung des Lichts wirkt der Kern verwaschen und erscheint nicht als deutlich abgegrenzte Fläche. Die Streuung wird auch durch die unterschiedlichen Brechungsindizes zwischen den Zellen verursacht. Zusätzlich produzieren Fibroblasten Kollagen, das sich in fadenförmiger Struktur zwischen den Zellen anlagert und einen hohen Anteil an C-H-Verbindungen aufweist. Die angeregten Kollagen-Fasern führen zu einer diffusen Beleuchtung im Bild, da ein großer Bereich beleuchtet wird. Ähnlich wie bei der Fluoreszenz-Bildgebung ist die Beleuchtung in den Raman-Bildern auf einer Seite stärker.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ergänzenden Informationen aus den Raman-, Fluoreszenz- und Rayleigh-Bildgebungen umfassendere Ergebnisse über die molekulare Zusammensetzung von 3D-Zellkulturen liefern. Die dargestellten Bilder zeigen, dass das LSRM als Technik funktioniert und einen wertvollen Beitrag zur detaillierten Analyse von Zellstrukturen leistet.

3.5 Vergleich der Raman-Messungen mit Referenz-Gerät

Um die vielversprechenden Ergebnisse zu validieren, wurde ein Vergleich mit einem in der Praxis relevanten, kommerziell erwerblichen Gerät durchgeführt. Hierbei erwies sich das Digital Light Sheet Mikroskop SP8 DLS (Leica Microsystems GmbH, Deutschland) als passende Wahl. Es ist ein hochmodernes Mikroskopiesystem, welches ein fluoreszenz-basiertes Lichtscheibenmikroskop mit einem konfokalen Mikroskop kombiniert. Es dient als Referenzgerät, da keine kommerzielle Variante eines Raman-Light-Sheet-Mikroskops zur Verfügung stand. Als Probenmaterial dient ein HT29-Fibroblasten-Sphäroid. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich nicht um denselben Sphäroiden handelt, der in den vorherigen Messungen verwendet wurde. Dies resultiert aus der Anwendung von Fluoreszenzmarkern nach den Raman-Messungen, um eine bessere Visualisierung der Zellen zu ermöglichen. Der Ablauf der Messungen umfasst zunächst die Einbettung des Sphäroids in einen Agarose-Gelblock, um eine stabile und gut positionierte Probe für die weiteren Schritte zu

gewährleisten. Anschließend werden Bilder und Spektren des Sphäroids mithilfe des Leica-LSRM erfasst. Nach erfolgreichen Messungen wird das eingebettete Sphäroid gereinigt. Im Anschluss erfolgt eine Nachbehandlung, um das Sphäroid nachträglich einzufärben. Es wurde im Vorfeld bestätigt, dass diese Nachbehandlungstechnik erfolgreich angewendet werden kann, um zusätzliche Informationen zu gewinnen. Die aufgenommenen Bilder und Spektren werden sorgfältig analysiert und anschließend miteinander verglichen, um sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den beiden Systemen zu identifizieren. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass aufgrund der unterschiedlichen Lichtblattstärken der direkte Vergleich der Systeme nur bedingt möglich ist. Das Leica-System ermöglicht eine feinere Schrittweite von 2 μm im Vergleich zur Schrittweite von 10 μm beim LSRM. Dies bedeutet, dass das Leica-System eine höhere Anzahl von Informationen pro Durchgang liefert. Ein weiterer Unterschied liegt in der Art und Weise, wie das Licht in den Schnitt eindringt. Aufgrund des dickeren Schnitts beim LSRM kann es zu einer höheren Intensitätsschwankung innerhalb des Schnitts kommen. Im Gegensatz dazu ist das Leica-System darauf ausgerichtet, eine homogenere Ausleuchtung zu gewährleisten, was zu einer gleichmäßigeren Intensitätsverteilung führt. Trotz dieser Unterschiede bieten sowohl das LSRM als auch das Leica-System wertvolle Informationen über den Sphäroiden.

Die dargestellten Aufnahmen zeigen insgesamt vier Querschnitte des Sphäroids in verschiedenen Tiefen. Der Vergleich der Bilder und Spektren mit den Ergebnissen des Leica SP8 DLS erlaubt eine umfassende Validierung der gewonnenen Daten. Dabei können sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in den räumlichen und spektralen Informationen festgestellt werden.

Der erste Schnitt am Anfang des Sphäroids wird in Abbildung 93 veranschaulicht. Die Laserleistung von Laser 2 wurde auf 130 mW eingestellt, um eine ausreichende Anregungsintensität zu gewährleisten. Für die Bildaufnahme wurde eine Integrationszeit von 5000 ms verwendet, um eine gute Signalaufnahme zu ermöglichen. Bei der spektroskopischen Aufnahme wurde eine längere Integrationszeit von 20 s verwendet, um eine ausreichende Signalamplitude zu erzielen. Um den gewünschten Detektionsbereich abzudecken, wird der AOTF auf eine Wellenlänge von 817 nm eingestellt. Dies entspricht einem spezifischen Raman-Detektionsbereich zwischen 2800 und 2900 cm^{-1} . Durch die Auswahl dieses Bereichs können spezifische Raman-Signale erfasst und analysiert werden, die charakteristisch für die untersuchten Moleküle oder molekularen Gruppen sind.

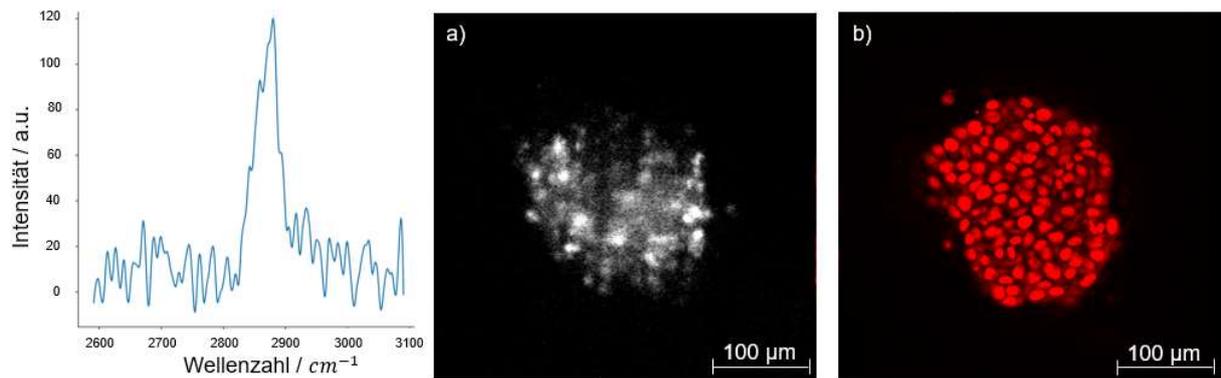


Abbildung 93: Erster Schnitt (10 µm im Sphäroid) des Vergleichs zwischen a) dem Raman-Bild des LSRM mit angehängtem Spektrum und b) dem Referenzsystem Leica SP8 DLS. Die Aufnahme des LSRM erfolgt mit dem 660 nm Laser bei einer Lichtleistung von 130 mW und einer Integrationszeit von 5000 ms bei dem Bild und 20 s bei dem Spektrum.

Das Raman-Signal, das im relevanten Bereich der C-H-Streckschwingungen erfasst wurde, zeigt eine deutliche Intensität von 121 Counts und ein SNR von 6,05. Diese Erkenntnis bestätigt die eindeutige Detektion des Raman-Signals und die Verfügbarkeit der gewünschten Informationen zur molekularen Zusammensetzung des Sphäroids. Das Raman-Bild weist im Vergleich zum Leica-Bild eine geringere Schärfe auf, jedoch sind immer noch Konturen erkennbar, die mit den Konturen im Leica-Bild übereinstimmen. Dies deutet darauf hin, dass das Raman-Bild trotz der Unschärfe relevante Informationen über die räumliche Verteilung der Moleküle im Sphäroid liefert. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass das Raman-Bild starke Unterschiede in verschiedenen Bereichen des Sphäroids aufweist, während das Leica-Bild eine relativ homogene Ausleuchtung aufweist. Dies ist auf die unterschiedlichen Schnittdicken der beiden Aufnahmen zurückzuführen. Trotz der nahezu übereinstimmenden Form des Sphäroids im Schnitt können sich zwischen den Bildern mögliche Rotationsabweichungen ergeben. Diese Abweichungen sind auf die unterschiedlichen Aufnahmemodalitäten und die zeitweiligen Anpassungen am Probenhalter zurückzuführen. Es ist wichtig zu beachten, dass es sich bei den untersuchten HT29-Fibroblasten-Zellkulturen um eine spezifische Art von Zellen handelt. Im vorliegenden Schnitt sind hauptsächlich HT29-Zellen oder genauer gesagt die Zellkerne sichtbar. Diese Zellen weisen aufgrund ihrer Eigenschaften und der Interaktion mit Kollagen einen hohen Anteil an C-H-Verbindungen auf. Dies erklärt die signifikante Raman-Aktivität im C-H-Streckschwingungsbereich und die Möglichkeit, durch Raman-Spektroskopie gezielt Informationen über diese Zellkomponenten zu erhalten.

Abbildung 94 präsentiert den zweiten Schnitt, der in einer Tiefe von 50 µm im Sphäroid aufgenommen wurde.

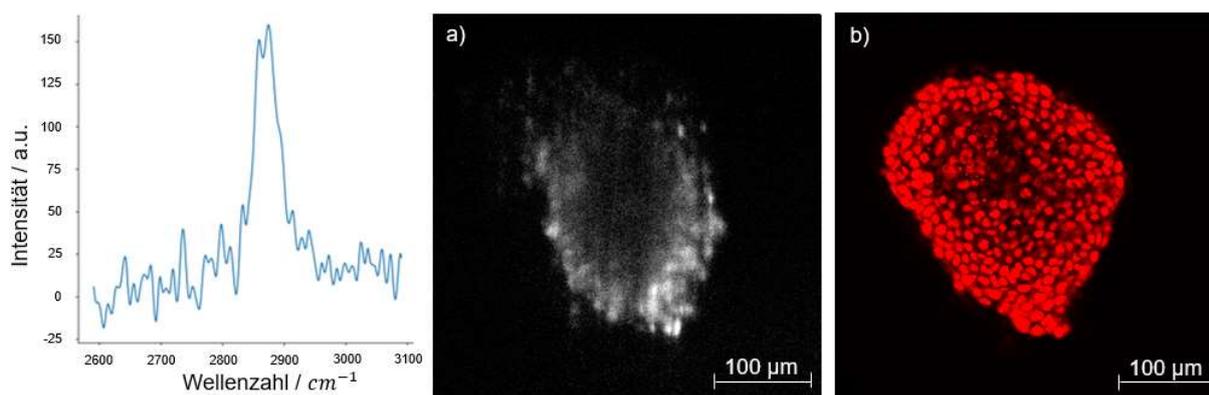


Abbildung 94: Zweiter Schnitt (50 µm im Sphäroid) des Vergleichs zwischen a) dem Raman-Bild des LSRM mit angehängtem Spektrum und b) dem Referenzsystem Leica SP8 DLS. Die Aufnahme des LSRM erfolgt mit dem 660 nm Laser bei einer Lichtleistung von 130 mW und einer Integrationszeit von 5000 ms bei dem Bild und 20 s bei dem Spektrum.

Bei einer Betrachtung des Leica-Bildes in einer Tiefe von 50 µm werden erste Veränderungen in Bezug auf die Zellzusammensetzung erkennbar. Insbesondere der Fibroblastenkern zeigt eine verstärkte Konzentration und erscheint dunkler, vor allem in der oberen linken Hälfte des Bildes. In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass die zuvor homogene Ausleuchtung nunmehr verschiedene Intensitätsgrade aufweist, was auf lokale Variationen in der Zellstruktur hinweisen könnte. Im Kontrast dazu präsentiert das Raman-Bild eine erheblich unschärfere Abbildung. Es sind nur noch vereinzelt Zellkerne am unteren rechten Rand des Bildes erkennbar, während das Zentrum des Bildes dunkel und unscharf erscheint. Besonders die Ränder in der oberen linken Hälfte des Bildes wirken verwaschen und unklar. Trotz dieser Unschärfe lässt sich jedoch anhand des Spektrums feststellen, dass das Raman-Signal eindeutig detektierbar ist, mit einer Intensität von 156 Counts und einem Signal-Rausch-Verhältnis von 7,8.

Die nächste Abbildung mit der Bezeichnung 95 zeigt den Schnitt des Sphäroids in einer Tiefe von 110 µm. In diesem Bild sind zusätzliche Variationen in der Zusammensetzung und Anordnung der Zellen zu erwarten.

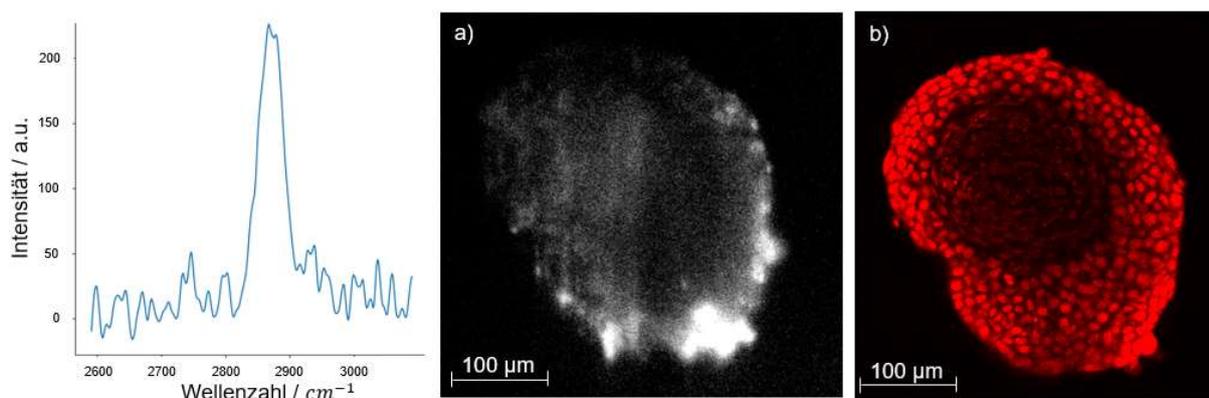


Abbildung 95: Dritter Schnitt (110 µm im Sphäroid) des Vergleichs zwischen a) dem Raman-Bild des LSRM mit angehängtem Spektrum und b) dem Referenzsystem Leica SP8 DLS. Die Aufnahme des LSRM erfolgt mit dem 660 nm Laser bei einer Lichtleistung von 130 mW und einer Integrationszeit von 5000 ms bei dem Bild und 20 s bei dem Spektrum.

Im Leica-Bild des nachfolgenden Schnitts ist deutlich ein schwarzer Kern erkennbar, der durch die Anwesenheit von Fibroblasten entsteht und von den umgebenden HT29-Zellen umschlossen wird. Dieser Kontrast zwischen den Fibroblasten und den HT29-Zellen ist auch im Raman-Bild erkennbar, wobei der Fibroblastenkern eine höhere Intensität aufweist als die restlichen Bestandteile des Sphäroids. Im unteren rechten Bereich des Bildes sind einige Bereiche stark überbelichtet, was auf direkte Laserstrahlung auf die Probe hinweist. Dennoch lassen sich in diesem Bereich zwei Ausleger erkennen, die auch im Leica-Bild deutlich dargestellt werden. Das Raman-Spektrum, das aus diesem Schnitt gewonnen wurde, zeigt die bisher höchsten Werte, mit einer Intensität von 217 Counts und einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10,85. Dies unterstreicht die eindeutige Sichtbarkeit der Raman-Signale und bestätigt die Robustheit der Messungen.

Abschließend zeigt Abbildung 96 den Sphäroiden in einer Tiefe von 160 μm .

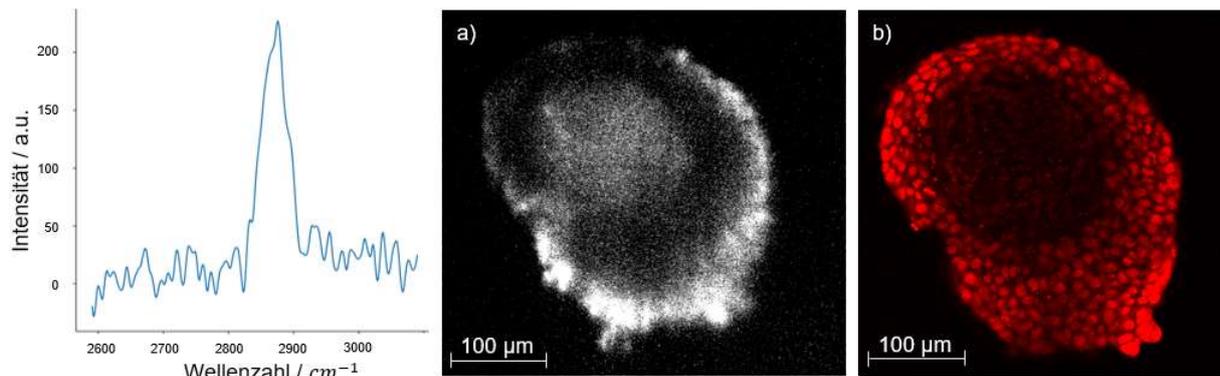


Abbildung 96: Vierter Schnitt (160 μm im Sphäroid) des Vergleichs zwischen a) dem Raman-Bild des LSRM mit angehängtem Spektrum und b) dem Referenzsystem Leica SP8 DLS. Die Aufnahme des LSRM erfolgt mit dem 660 nm Laser bei einer Lichtleistung von 130 mW und einer Integrationszeit von 5000 ms bei dem Bild und 20 s bei dem Spektrum.

Bei diesem Vergleich zeigt sich erneut, dass das Raman-Signal im Raman-Bild deutlich messbar ist, mit einer Intensität von 215 Counts und einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis von 10,75. Die Umriss der Zellkultur sind im Raman-Bild klar erkennbar wie beispielsweise an zwei Ausläufern des Sphäroids im unteren rechten Teil des Bildes zu sehen ist. Diese Ausläufer korrelieren auch mit den Konturen, die im Leica-Bild sichtbar sind. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass der im Leica-Bild schwarze Fibroblasten-Kern im Raman-Bild hell dargestellt wird. Dies ist auf die Produktion von Kollagen durch die Fibroblasten zurückzuführen. Kollagen ist eine Substanz, die reich an C-H-Verbindungen ist. Dadurch ist die lokale Konzentration dieser Verbindungen im Fibroblasten-Kern deutlich erhöht und im Raman-Bild sichtbar. Das ungefärbte Raman-Bild ermöglicht somit die Lokalisierung des Fibroblasten-Kerns innerhalb der Zellkultur, ohne dass aufwendige Färbungsverfahren erforderlich sind.

Generell lässt sich festhalten, dass die Raman-Bilder des LSRM zwar keine identischen Bilder bezüglich Auflösung und Bildschärfe im Vergleich zum Referenz-Gerät liefern, dennoch sind die Konturen der Zellkultur eindeutig identifizierbar und ein Vergleich der Bilder ist möglich. Die Raman-Bilder liefern auch ohne Färbung die gleichen Informationen wie das Leica-Gerät, jedoch mit einem Fokus auf die molekulare Zusammensetzung. Durch den Einsatz des LSRM kann in diesem Beispiel der Fibroblasten-Kern zuerst lokalisiert werden, bevor die Zelle überhaupt präpariert wird. Dies ermöglicht eine zeitsparende und effiziente Analyse von Zellstrukturen und deren Zusammensetzung, insbesondere bezüglich der Verteilung und Konzentration von C-H-Verbindungen.

4 Diskussion

In dieser Forschungsarbeit wurde ein Lichtscheibenmikroskop entwickelt, das eine nicht-invasive und dreidimensionale Darstellung von Zellkulturen ermöglicht. Dieses innovative Gerät kombiniert mehrere Messmethoden, darunter Rayleigh-, Fluoreszenz- und Raman-Bildgebung, und integriert sie nahtlos in ein tomographisch arbeitendes Lichtscheibenmikroskop. Zur Validierung des Systems wurde eine 3D-Zellkultur bestehend aus HT29-Zellen und Fibroblasten verwendet. Zur Vergleichbarkeit und Referenz dient das SP8 DLS von Leica Microsystems GmbH. Die Durchführung der Validierungsexperimente erbrachte überzeugende Ergebnisse, die die Eignung des entwickelten Lichtscheibenmikroskops für die Untersuchung von komplexen 3D-Zellkulturen bestätigen. Ein besonderer Vorteil des Systems liegt in seiner multimodalen Bildgebungsfähigkeit, die es ermöglicht, verschiedene Messmethoden gleichzeitig anzuwenden und so ein umfassendes Verständnis der untersuchten Zellstrukturen zu gewinnen. Darüber hinaus zeichnet sich das System durch seine geringe Anforderung an die Probenpräparation aus, was Experimente effizienter und zeitsparender gestaltet. In der ausführlichen Diskussion der Ergebnisse werden die technischen Parameter des LSRM kritisch bewertet und im Zusammenhang mit den erzielten Messergebnissen interpretiert. Dabei werden auch die Herausforderungen und Limitationen des Systems diskutiert und mögliche Verbesserungen und Optimierungen aufgezeigt. In einem weiteren Diskussionspunkt wird auf die potenzielle Anwendung des Systems sowohl im Forschungslabor als auch in der klinischen Praxis eingegangen. Abschließend wird ein Ausblick auf zukünftige Entwicklungen und Weiterentwicklungen des Lichtscheibenmikroskops gegeben. Es werden mögliche Modifikationen und Erweiterungen des Systems diskutiert, die zu einer weiteren Verbesserung der Bildqualität, Auflösung und Anwendungsmöglichkeiten führen könnten. Dabei werden auch neue Technologien und Methoden erwähnt, die in Zukunft in das Lichtscheibenmikroskop integriert werden könnten, um noch detailliertere Einblicke in die komplexe Welt der Zellkulturen zu ermöglichen.

4.1 Technische Bewertung des LSRM

Die technische Bewertung des LSRM erfolgt durch eine Analyse der einzelnen Komponenten, die für den Aufbau des Mikroskops verwendet werden. Jeder Abschnitt des Mikroskops wird zunächst eigenständig bewertet, um seine Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit zu beurteilen. Nachfolgend werden Schlussfolgerungen bezüglich potenzieller Konsequenzen für das Gesamtsystem gezogen. Darüber hinaus wird am Ende eine Bewertung des technischen Risikos des vollständigen Aufbaus vorgenommen.

Aufbau und Betrieb des LSRM

Die technische Umsetzung des LSRM im Labor erfolgte mit dem Ziel, ausreichend Platz zwischen den einzelnen Komponenten zu gewährleisten. Dies dient primär dazu, mögliche Kollisionen zwischen den Komponenten zu vermeiden und eine präzise Ausrichtung der Laserstrahlen zu ermöglichen. Durch die Verwendung geeigneter Komponenten wird sichergestellt, dass das Gerät seine Funktion vollständig erfüllt. Allerdings ist es wichtig zu beachten, dass die verwendeten Komponenten sehr empfindlich gegen Stöße sind. Selbst kleinste Vibrationen können zu Verschiebungen optischer Elemente führen und somit die Bildqualität beeinträchtigen. Um dem entgegenzuwirken, wurde das LSRM-System auf einem pneumatisch schwingungsgedämpften Tisch montiert. Dieser Tisch kann einen Großteil der externen Vibrationen absorbieren und minimieren. Jedoch bietet er keinen ausreichenden Schutz gegen interne Kollisionen zwischen den Komponenten. Insbesondere die einstellbaren Komponenten wie kinematische Spielhalter sind anfällig für versehentliche Stöße und sollten möglicherweise durch geeignete Maßnahmen wie Verkleben oder den Einsatz robusterer Komponenten geschützt werden. Während des Betriebs erfolgt ein häufiger Wechsel zwischen der Kamera und dem Spektrometeradapter. Dieser Wechsel führt zwangsläufig zu internen Vibrationen im System und kann zur Verstellung einzelner Komponenten führen. Besonders das Filterrad, an dem die Kamera und der Spektrometeradapter angebracht sind, ist einer permanenten mechanischen Belastung ausgesetzt. Infolgedessen können sich die verwendeten M8-Schrauben lockern und die Detektionsseite minimal verschieben. Eine regelmäßige Überprüfung und Nachjustierung dieser Komponenten ist daher erforderlich, um eine stabile und präzise Funktion des Systems sicherzustellen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass bei späteren Versionen des LSRM einige Umbauten durchgeführt werden, die eine Kollision mit der Probenkammer und der Zylinderlinse zur Folge haben könnten. Diese potenziellen Kollisionen könnten zu Veränderungen im System führen und sollten bei der Weiterentwicklung des Aufbaus berücksichtigt werden.

Es ist von entscheidender Bedeutung, diese technischen Herausforderungen zu identifizieren und geeignete Maßnahmen zu ergreifen, um die Stabilität, Robustheit und Zuverlässigkeit des LSRM-Systems zu verbessern. Dies kann durch den Einsatz von stoßfesten Komponenten, präzise abgestimmte Justage, regelmäßige Wartung und Überprüfung sowie eine sorgfältige Planung von Umbauten und Erweiterungen erreicht werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass das LSRM seine Funktion als hochwertiges Messinstrument in der Forschung und Analytik erfolgreich erfüllt.

Laser-Stabilität

Die durchgeführten Stabilitätsmessungen der Laser haben aufschlussreiche Erkenntnisse über ihr Verhalten bei unterschiedlichen Leistungsstufen geliefert. Man hat festgestellt, dass

die Laser tendenziell einer ausgeprägteren Fluktuation unterliegen im Vergleich zu höheren Leistungsstufen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Messergebnisse bei höheren Leistungen möglicherweise konsistenter sind. Es ist jedoch wichtig, bei beiden Lasern die vorgeschriebene Einschwingzeit t_0 von 60 Sekunden einzuhalten. Wird diese Zeit nicht beachtet, können die Abweichungen von den Sollwerten erheblich sein und bis zu 57% bei Laser 2 erreichen. Solch große Abweichungen können einen erheblichen Einfluss auf die Genauigkeit und Aussagekraft der Ergebnisse haben. Um das Ausmaß der Leistungsschwankungen genauer zu untersuchen, wurden die Standardabweichungen berechnet. Bei einer niedrigen Leistung von 1 mW beträgt die Standardabweichung von Laser 1 $\pm 6,63\%$, während Laser 2 eine Standardabweichung von $\pm 13,39\%$ aufweist. Diese Zahlen verdeutlichen, dass die tatsächlichen Leistungswerte der Laser signifikant variieren können. Bei maximaler Leistung verringern sich die Abweichungen auf $\pm 0,33\%$ für Laser 1 und $\pm 0,54\%$ für Laser 2. Auffallend ist, dass beide Laser unterschiedliche Verhaltensweisen hinsichtlich der Schwankungen aufweisen. Laser 1 weicht mit zunehmender Leistung stärker von den absoluten Sollwerten ab, wobei Abweichungen von bis zu 0,8 mW auftreten können. Im Gegensatz dazu werden die Sollwerte von Laser 2 mit einer bemerkenswert präzisen Abweichung von nur 0,15 mW erreicht. Diese Abweichung hat jedoch bei höheren Leistungen nur einen geringen Einfluss auf die Messergebnisse. Es lässt sich also zusammenfassen, dass niedrige Leistungen tendenziell größere Schwankungen aufweisen, die erhebliche Auswirkungen auf die Ergebnisse haben können. Es sei jedoch angemerkt, dass niedrige Leistungen lediglich für die Rayleigh-Konfiguration verwendet werden, die hauptsächlich zur Qualitätskontrolle und ersten Visualisierung der zu untersuchenden Probe dient. Hier werden molekulare Informationen nur grob herausgefiltert. Bei den höheren Leistungsstufen, insbesondere bei der Fluoreszenz- und Raman-Konfiguration, laufen die Laser stabil und die erzeugten Messergebnisse sind zuverlässiger und reproduzierbarer.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die derzeit verwendeten Laser grundsätzlich für die aktuelle Anwendung geeignet sind. Dennoch ist es wichtig, die Leistungsschwankungen im Auge zu behalten, da sie insbesondere bei geringen Abweichungen zu signifikanten Unterschieden führen können. Eine mögliche Optimierungsmöglichkeit besteht darin, in neue Laser zu investieren, die eine noch bessere Stabilität aufweisen und somit zu noch präziseren Messergebnissen führen könnten.

Lichtblatt-Dimensionen

Die generierten Lichtblätter weisen mit einer Dicke von 8,4 μm (Laser 1) bzw. 8 μm (Laser 2) eine schmale Taille auf, die jedoch um die Faktoren 2,78 bzw. 3,3 von den theoretisch ermittelten Werten abweicht. Diese Abweichung ist hauptsächlich auf technische Beschränkungen der verwendeten Komponenten zurückzuführen, die eine weitere

Optimierung nur in begrenztem Umfang ermöglichen. Während der Justage wurde festgestellt, dass trotz eines erheblichen Zeitaufwands die Dicke des Lichtblatts nur um wenige hundert Nanometer weiter optimiert werden konnte. Eine weitere Optimierung wäre mit einem beträchtlichen Aufwand verbunden, ohne dass die erwarteten Verbesserungen in einem angemessenen Verhältnis dazu stehen. Grundsätzlich ist es wichtig zu betonen, dass eine Abweichung um den Faktor 3 bei der Justage der Dicke des Lichtblatts zwischen dem realen Wert und dem theoretischen Wert in den meisten Fällen nicht akzeptabel ist. Die Dicke des Lichtblatts spielt eine entscheidende Rolle für die Ausbreitung und Fokussierung des Lichts und sollte daher präzise kontrolliert und justiert werden, um die gewünschten optischen Eigenschaften zu erreichen. Die signifikante Abweichung lässt den Schluss zu, dass potenzielle Abweichungen in der Justage oder etwaige Mängel bzw. Schwierigkeiten mit den eingesetzten Komponenten vorhanden sein könnten. Diese Abweichung wirkt sich negativ auf die Leistung des Lichtstrahls aus und kann zu ungenauen Messungen, reduzierter Auflösung oder anderen unerwünschten Effekten führen. Insbesondere in Anwendungen, die hohe Präzision erfordern, wäre eine Abweichung um den Faktor 3 nicht akzeptabel. Es ist daher von großer Bedeutung, die Ursache für eine derart große Abweichung zu identifizieren und geeignete Maßnahmen zu ergreifen, um die Lichtblattdicke zu verbessern und den Unterschied zum theoretischen Wert zu minimieren. Dies könnte die Überprüfung und Kalibrierung der verwendeten Komponenten, die Optimierung der Justagetechniken oder gegebenenfalls den Austausch defekter Teile umfassen. Es ist von entscheidender Bedeutung, zu beachten, dass die akzeptable Abweichung von der theoretischen Dicke des Lichtblatts stark von der spezifischen Anwendung und den individuellen Anforderungen abhängt. In einigen Szenarien, in denen eine hohe Genauigkeit keine ausschlaggebende Rolle spielt, mag eine Abweichung um den Faktor 3 möglicherweise noch akzeptabel sein. Allerdings wird in den meisten wissenschaftlichen und technischen Anwendungen, insbesondere bei präzisen Messungen oder gezielten Manipulationen, eine weitaus geringere Abweichung angestrebt. In dem vorliegenden System ist die festgestellte Abweichung, obwohl sie signifikant ist, immer noch in einem tolerierbaren Bereich, da die Auflösung des Lichtblatts nach wie vor ausreicht, um größere Zellstrukturen zu erfassen. Das bedeutet, dass trotz der Abweichungen die grundlegenden Ziele und Anforderungen der Anwendung nach wie vor erfüllt werden können.

Es ist von Bedeutung zu betonen, dass eine präzise Abstimmung der Lichtblattdicke unabdingbar ist, da sie unmittelbaren Einfluss auf die Ausbreitung und Fokussierung des Lichts ausübt. Abweichungen im Bereich von bis zu einem Faktor 3 deuten auf erhebliche Diskrepanzen zwischen der tatsächlichen und der angestrebten theoretischen Dicke hin. Daher ist es ratsam, die Ursachen für diese Abweichungen sorgfältig zu analysieren und entsprechende Schritte zur Verbesserung der Lichtblatt-Justage einzuleiten. Dies könnte eine

eingehendere Untersuchung der verwendeten Komponenten, eine noch präzisere Kalibrierung, die Entwicklung oder Anwendung fortschrittlicherer Justagetechniken sowie gegebenenfalls den Einsatz hochwertigerer Komponenten umfassen.

Genauigkeit der Verfahreinheit

Die Verfahreinheit, die aus mehreren Einzelachsen besteht, zeigt signifikante Abweichungen von bis zu 42,86 % in Bezug auf den einzelnen Schritt. Dies führt zu einer maximalen Abweichung von 0,63 μm bei einem durchschnittlichen Schritt von 1,47 μm . Obwohl dies in absoluten Zahlen möglicherweise gering erscheint, ist es angesichts des Anwendungsbereichs eine zu hohe Abweichung. Interessanterweise zeigt sich jedoch, dass längere Fahrwege zu einer verbesserten Genauigkeit und Wiederholbarkeit führen. Allerdings steht dies im Konflikt mit der Anforderung des Systems, mit einem möglichst dünnen Lichtblatt zu arbeiten. Somit ergibt sich ein gewisses Dilemma, da das System in Bezug auf die Lichtblattstärke optimiert ist, jedoch bei der Präzision und Wiederholbarkeit der Bewegungseinheiten hinter den Erwartungen zurückbleibt. Im Falle einer Optimierung des Lichtblatts ist es von entscheidender Bedeutung, die Verfahreinheit kritisch zu betrachten und möglicherweise in Betracht zu ziehen, sie durch eine zuverlässigere Einheit zu ersetzen. Für die aktuelle Anwendung, bei der Schritte von 8 μm verwendet werden, ist dies noch ausreichend. Das dickere Lichtblatt kann geringfügige Abweichungen in der Verfahrensgenauigkeit tolerieren.

Funktionsweise des AOTFs

Der bildgebende AOTF zeigt zweifellos eine herausragende Eigenschaft durch seine kontinuierliche Abstimmbarkeit und seinen umfassenden Anwendungsbereich von 550 bis 1000 nm. Dieser Bereich deckt praktisch die gesamte nutzbare Bandbreite des LSRM ab. Diese Eigenschaft ermöglicht die exakte Erfassung einzelner schmaler, scharfer Spitzen, was insbesondere in Anwendungen mit spezifischen Anforderungen an die Wellenlängenselektion von großem Nutzen ist. Jedoch geht mit dieser Bandbreite auch eine erhebliche Einschränkung einher, da die Möglichkeit der breitbandigen Erfassung von Messsignalen stark begrenzt ist. Ein weiterer kritischer Aspekt des AOTF ist die Wellenlängenabhängigkeit seiner Bandbreite. Unterschiedliche Laserquellen können dadurch unterschiedlich breite Peaks erzeugen, selbst bei Verwendung der gleichen Einstellungen am AOTF. Dies führt zu inkonsistenten Messergebnissen und erfordert eine sorgfältige Kalibrierung vor jeder Messung, um den gewünschten Wellenlängenbereich genau zu erfassen. Ein weiterer limitierender Faktor des AOTF ist sein wellenlängenabhängiger Abstrahlwinkel. Dies führt dazu, dass Bilder mit unterschiedlichen Wellenlängen nie vollständig kongruent sind. Folglich ist eine anspruchsvolle und zeitintensive softwareseitige Nachbearbeitung erforderlich, um die auftretenden Bildverzerrungen zu korrigieren. Die Unschärfen und Verzerrungen, die durch

den AOTF verursacht werden, können die Genauigkeit und Qualität der erfassten Bilder erheblich beeinträchtigen. Zusätzlich besteht das Risiko, dass während des Wechsels zwischen der Kamera und dem Spektrometeradapter Vibrationen auftreten können. Diese Vibrationen könnten eine Verschiebung des Filterrades bewirken und somit dazu führen, dass der nullte Strahlengang in das Bild mit dem gewünschten Wellenlängenbereich einfällt. Eine solche Situation könnte erhebliche Verzerrungen der Messergebnisse verursachen.

Es ist wichtig, diese Nachteile des AOTF bei der Weiterentwicklung des LSRM kritisch zu betrachten und geeignete Maßnahmen zu ergreifen, um sie zu überwinden. Dies kann die Entwicklung von verbesserten Kalibrierverfahren, die Minimierung der Bandbreitenvariation durch sorgfältige Auswahl der Laserquellen und die Anwendung fortschrittlicher Bildverarbeitungstechniken zur Kompensation von Verzerrungen und Unschärfen umfassen. Darüber hinaus bietet die Verwendung eines Lasers mit kürzerer Wellenlänge, wie beispielsweise mit einer Wellenlänge von 532 nm, die Möglichkeit, den optimalen Arbeitsbereich des AOTF mit einer Bandbreite von 2,2 nm bei einer Wellenlänge von 589 nm auszunutzen. Dies kann zu verstärkten Fluoreszenzsignalen führen und die Anregung weiterer Fluorophore sowie den Raman-Effekt ermöglichen, um die Leistungsfähigkeit des Systems deutlich zu verbessern. Ein umfassendes Verständnis der Stärken und Schwächen des AOTF ist daher von entscheidender Bedeutung, um die volle Potenzialentfaltung des LSRM voranzutreiben und dessen Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern.

Pixel-Stabilität

Die Kamera-Bilder sind von zentraler Bedeutung für die Analyse des Aufbaus und dienen als Grundlage für die Auswertung. Allerdings weisen sie erhebliche Schwankungen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Pixelwerte innerhalb einer Messreihe stark variieren können. Insbesondere in der Rayleigh-Konfiguration sind die Abweichungen zwischen den einzelnen Pixeln besorgniserregend hoch und erreichen einen Wert von bis zu 37,59 %. Noch bedenklicher ist die Tatsache, dass die Abweichungen von Pixel zu Pixel innerhalb derselben Messung eine Spanne von bis zu 51,96 % aufweisen können. Dies verdeutlicht, dass die erfassten Daten stark von den individuellen Pixeln abhängig sind und somit die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Messergebnisse beeinträchtigt wird. Im Vergleich dazu sind die Abweichungen in der Raman-Konfiguration geringer, aber dennoch vorhanden. Hier beträgt die maximale Abweichung eines einzelnen Pixels 15,33 % und die Spanne innerhalb einer Messung liegt bei 23,19 %. Während die durchschnittlichen absoluten Pixelwerte in den verschiedenen Bereichen bei den Rayleigh-Messungen bei 2001 (Bereich 1), 2159 (Bereich 2) und 257 (Bereich 3) liegen, sind sie bei den Raman-Messungen mit 95 (Bereich 1), 70 (Bereich 2) und 124 (Bereich 3) wesentlich geringer. Daher sind auch die tatsächlichen Abweichungen bei der

Raman-Messung maximal im niedrigen zweistelligen Bereich anzusiedeln. Obwohl diese Werte im Vergleich zur Rayleigh-Konfiguration niedriger sind, sind sie dennoch bedeutend und dürfen nicht außer Acht gelassen werden.

Die Ursachen für diese Pixel-Schwankungen sind vielfältig. Ein wesentlicher Faktor ist die Stabilität der verwendeten Laser. Insbesondere bei niedrigen Leistungsstufen, wie sie in der Rayleigh-Konfiguration eingesetzt werden, zeigen die Laser erhebliche Schwankungen. Dies führt zu signifikanten Unterschieden in den aufgenommenen Signalen. Obwohl sich diese Schwankungen nur auf Laser 2 beziehen, ist anzunehmen, dass ähnliche Schwankungen auch bei Laser 1 auftreten, da der Aufbau identisch ist. Bei höheren Leistungsstufen lässt sich eine gewisse Reduktion der Pixel-Schwankungen beobachten, dennoch bleiben sie bestehen. Ein weiterer kritischer Faktor, der zu den Abweichungen beiträgt, ist der AOTF. Aufgrund der kontinuierlichen Vibration des Kristalls im AOTF ergibt sich eine geringfügige Verzerrung der erfassten Bilder. Dies führt wiederum zu Fluktuationen in den Pixelwerten. Als Folge sind die aufgenommenen Bilder nicht stationär, was eine aufwändige nachträgliche Bildverarbeitung erforderlich macht, um die Verzerrungen zu korrigieren und die Bildqualität zu erhöhen. Angesichts dieser Schwankungen und Abweichungen stellt sich die Frage nach der Verlässlichkeit der Kamerabilder als Grundlage für die Analyse. Die hohe Variabilität der Pixelwerte innerhalb einer Messung wirft Zweifel an der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf. Eine mögliche Lösung besteht darin, Mittelwerte über mehrere Bilder und Spektren zu bilden, um die Schwankungen auszugleichen. Durch diesen Ansatz könnten potenzielle Fehlerquellen reduziert und die Genauigkeit der Messungen erhöht werden.

Ein möglicher Ansatz besteht darin, die Laserquellen zu stabilisieren. Insbesondere bei niedrigen Leistungsstufen können die Schwankungen in den Signalen verringert werden, indem hochpräzise Laserstabilisierungstechniken eingesetzt werden oder Feedback-Schleifen zur Regelung der Laserleistung implementiert werden. Hierbei könnten hochwertigere AOTF-Komponenten zum Einsatz kommen oder vibrationsdämpfende Mechanismen implementiert werden. Zusätzlich ist eine genaue Kalibrierung des Systems vor jeder Messung von großer Bedeutung, um Abweichungen in den Pixelwerten zu korrigieren. Des Weiteren kann eine sorgfältige Bildnachbearbeitung Verzerrungen minimieren und die Qualität der Bilder verbessern. Fortschrittliche Bildverarbeitungstechniken wie Rauschunterdrückung, Entzerrungsalgorithmen und Kontrastverbesserung können hierbei zum Einsatz kommen.

Eine gründliche Analyse der aufgenommenen Daten ist ebenfalls wichtig, um Ausreißer und fehlerhafte Pixelwerte zu identifizieren und zu korrigieren. Durch die Implementierung automatisierter Fehlererkennungsmechanismen und Qualitätskontrollen kann die Zuverlässigkeit der Messungen erhöht werden. Darüber hinaus spielt die kontinuierliche Weiterentwicklung der Bildaufnahmetechnologie eine entscheidende Rolle. Durch den Einsatz

hochauflösender Kamerasensoren mit verbesserter Stabilität und geringeren Rausch-eigenschaften kann die Robustheit des Systems insgesamt verbessert werden.

4.2 Beurteilung der Messergebnisse

Zur Bewertung der Messergebnisse wird eine separate Analyse der verschiedenen Einstellmöglichkeiten des LSM durchgeführt. Für jeden Abschnitt werden relevante Kriterien wie Bildauflösung, Kontrast und Schärfe herangezogen, um die Leistungsfähigkeit des LSM in Bezug auf die jeweilige Einstellung zu bewerten. Dabei werden auch potenzielle Artefakte oder Einschränkungen berücksichtigt. Nach der Einzelbewertung der verschiedenen Modalitäten erfolgt eine Zusammenführung der Ergebnisse in einer 3D-Darstellung. Dabei können Gemeinsamkeiten, Unterschiede und mögliche Synergien zwischen den einzelnen Einstellungen identifiziert werden.

Rayleigh-Konfiguration

Durch die Verwendung von elastischem Licht in der Rayleigh-Konfiguration werden wichtige Informationen über die morphologischen Eigenschaften der Probe gewonnen. Die aus diesen Aufnahmen resultierenden, gut ausgeleuchteten Bilder vermitteln wertvolle Einblicke in die äußeren Strukturen des Sphäroids, einschließlich seiner Dimensionen, Gestalt und der räumlichen Anordnung der Zellen. Dies ist von essenzieller Bedeutung für eine grundlegende Charakterisierung der Probe und für die ersten Beurteilungen ihrer strukturellen Integrität und Homogenität. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von elastischen Lichts liegt in der Fähigkeit, erste Hinweise auf spezifische Moleküle oder Substrukturen innerhalb des Sphäroids zu gewinnen. Dies wird auch durch die gemessene Dispersion ermöglicht, die bei sonst gleichbleibenden Materialeigenschaften zu unterschiedlichen Streuintensitäten bei verschiedenen Wellenlängen führt. Durch die Analyse des elastischen Lichts kann wertvolle Information über die zelluläre Zusammensetzung und die Verteilung spezifischer Moleküle gewonnen werden. Dies erlaubt es, erste molekulare Einblicke zu erlangen und Hypothesen über die Zusammensetzung des Sphäroids zu formulieren.

Es ermöglicht auch eine Qualitätskontrolle, um festzustellen, ob die zu untersuchende Probe überhaupt für eine umfassende Untersuchung geeignet ist. Wenn bei der Rayleigh-Konfiguration Unregelmäßigkeiten oder Anomalien in der äußeren Struktur des Sphäroids festgestellt werden, können weitere Schritte zur Beurteilung der Probe eingeleitet werden, um sicherzustellen, dass die darauffolgenden Untersuchungen zuverlässige Ergebnisse liefern. Die gewonnenen Bilder dienen jedoch nicht nur als Qualitätskontrolle, sondern auch als Ausgangspunkt für weitere modalitätsspezifische Untersuchungen. Durch den Abgleich der Rayleigh-Aufnahmen mit Bildern, die mit anderen Modalitäten erfasst wurden, können

umfassendere Erkenntnisse über die molekularen und zellulären Merkmale der Probe erlangt werden. Jede Modalität hat ihre eigene spezifische Stärke und bietet einzigartige Informationen über verschiedene Aspekte der Probe, wie z. B. die Verteilung bestimmter Moleküle, die Funktion von Zellstrukturen oder die dynamischen Prozesse in der Probe.

Indem die Ergebnisse der Rayleigh-Konfiguration mit den Ergebnissen anderer Modalitäten kombiniert werden, wird ein umfassenderes Verständnis der untersuchten Probe entwickelt. Dieser Ansatz ermöglicht es, sowohl strukturelle als auch funktionelle Informationen zu erfassen und ein ganzheitliches Bild der Probe zu erhalten.

Fluoreszenz-Konfiguration

Die Fluoreszenz-Konfiguration ermöglicht nicht nur die Anwendung der etablierten Methode der Fluoreszenz-Bildgebung, sondern bietet auch einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Ansätzen. Insbesondere die Fähigkeit, sowohl die Autofluoreszenz der Probe als auch potenziell gefärbte Proben darzustellen, ist hervorzuheben. Die Möglichkeit, verschiedene Wellenlängen des Anregungslasers auszuwählen, ermöglicht die Visualisierung von strukturellen Unterschieden und molekülabhängigen Veränderungen, wie in den dargestellten Bildern zu sehen ist. Die Autofluoreszenz liefert wertvolle Informationen über die Zusammensetzung der Zellkultur. Die hohe Flexibilität des AOTF ermöglicht grundsätzlich die Betrachtung aller relevanten Wellenlängenbereiche. Es ist jedoch zu beachten, dass die geringe Bandbreite des AOTFs ein potenzieller Nachteil bei der Fluoreszenz-Bildgebung sein kann, da nur ein Bruchteil des normalerweise breitbandigen Fluoreszenzsignals durchgelassen wird. Trotzdem können die ausgewählten Bilder Informationen liefern, die zu einem verbesserten Verständnis der Zusammensetzung der Zellkultur beitragen.

Insgesamt eröffnet die Kombination von Fluoreszenz- und anderen Messmethoden in diesem Mikroskop neue Perspektiven für die Untersuchung von Zellkulturen. Durch die Darstellung der Autofluoreszenz und die gezielte Auswahl der Anregungswellenlängen können sowohl strukturelle als auch molekulare Informationen gewonnen werden, die zu einem umfassenderen Bild der Zusammensetzung der Zellen beitragen.

Raman-Konfiguration

Die Raman-Konfiguration des LSRM bietet eine Vielzahl von Vorteilen und Herausforderungen bei der Anwendung. Einer der Hauptvorteile besteht darin, dass Raman-Bilder molekülspezifische Informationen liefern können. Durch die selektive Anregung bestimmter Raman-Peaks mit der geringen Bandbreite des AOTFs können spezifische Moleküle oder Molekülgruppen in der Probe identifiziert und dargestellt werden. Dies ermöglicht eine präzise Analyse der Zusammensetzung und Verteilung von Molekülen in den untersuchten Zellstrukturen. Ein weiterer Vorteil der Raman-Anwendung ist die nichtinvasive Charakteristik

der Methode. Die Abwesenheit der Notwendigkeit einer speziellen Probenpräparation führt zu Zeit- und Aufwandsersparnissen. Gleichzeitig verringert sie das Risiko einer Veränderung oder Beschädigung der Probe. Zudem bietet die Raman-Spektroskopie eine hohe räumliche Auflösung, was die Darstellung feinsten Details der Zellstrukturen ermöglicht.

Allerdings gibt es auch einige Herausforderungen und potenzielle Nachteile bei der Verwendung des LSM. Ein Hauptnachteil ist die geringe Signalintensität des Raman-Signals im Vergleich zur Fluoreszenz. Dies erfordert längere Integrationszeiten, um ausreichend Signalstärke für die Detektion zu erreichen. Dadurch wird die Messdauer verlängert, was eine Einschränkung darstellen kann, insbesondere bei empfindlichen oder sich bewegenden Proben. Ein weiterer Nachteil ist die Empfindlichkeit des Raman-Signals gegenüber Streueffekten. In biologischen Proben, wie in dem hier verwendeten Sphäroiden, kann Streuung zu einer Verwischung der räumlichen Auflösung und einer verminderten Bildqualität führen. Zudem können intrinsische Autofluoreszenzsignale das schwache Raman-Signal überlagern und die Erkennung spezifischer Peaks erschweren. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Beurteilung der Messergebnisse berücksichtigt werden muss, ist die begrenzte Eindringtiefe des Raman-Signals in die Zellkultur. Aufgrund von Absorption und Streuung in den Gewebeschichten wird das Raman-Signal mit zunehmender Tiefe abgeschwächt. Dies führt dazu, dass nur oberflächennahe Bereiche der Probe für die Analyse zugänglich sind. Die begrenzte Eindringtiefe des Raman-Signals hat Auswirkungen auf die Ausleuchtung der Bildschnitte.

Um diesem Effekt entgegenzuwirken, können verschiedene Maßnahmen ergriffen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Eindringtiefe des Raman-Signals durch die Verwendung von Laserstrahlen mit längeren Wellenlängen zu erhöhen, da diese eine geringere Absorption in biologischem Gewebe aufweisen. Zudem kann die Positionierung der Probe in der Probenkammer optimiert werden, um eine gleichmäßigere Ausleuchtung und eine bessere Erfassung der oberflächennahen und tieferen Schichten zu gewährleisten.

Trotz dieser Herausforderungen bietet die Raman-Konfiguration des Lichtscheibenmikroskops eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung von Zellstrukturen.

3D-Modell

Die generierten Bilder zeigen deutliche Strukturen, die je nach Modalität an unterschiedlichen Positionen sichtbar sind. Um jedoch eine präzisere Darstellung einzelner Auffälligkeiten zu erzielen, sind weitere bildverarbeitende Maßnahmen erforderlich, wie zum Beispiel die Überlagerung der verschiedenen Modalitäten. Besonders wichtig ist dabei das Entfernen des Hintergrunds, um Störsignale zu vermeiden und eine klare Abbildung zu gewährleisten. Trotz dieser Anpassungen wird die allgemeine Darstellung der 3D-Bilder als vorteilhaft angesehen.

Aufgrund der unterschiedlichen Ausleuchtung in den verschiedenen Modalitäten ist es jedoch notwendig, zusätzliche Filter und eine Anpassung der Beleuchtungsintensität über das gesamte Bild hinweg einzusetzen. Darüber hinaus müssen die Bilder sorgfältig registriert und übereinandergelegt werden, um eine präzise und kohärente Visualisierung zu erreichen. Die aktuellen 3D-Bilder liefern bereits wichtige Informationen über die Struktur und Verteilung selektiver Stoffe innerhalb der 3D-Zellkultur. Sie dienen als erstes Indiz und ermöglichen eine qualitative Beurteilung. Um jedoch eine umfassendere Analyse und Interpretation der Ergebnisse durchzuführen, ist die Überlagerung der Informationen aus den verschiedenen Modalitäten sinnvoll.

Vergleich mit einem Referenzsystem

Die wissenschaftliche Analyse zielt darauf ab, das kommerziell erhältliche Lichtblattemikroskop Leica SP8 DLS mit dem selbstgebauten auf dem Raman-Effekt basierenden LSRM zu vergleichen. Obwohl das kommerzielle Gerät auf Fluoreszenz basiert, zeigen die Ergebnisse vergleichbare Informationen mit den Daten des LSRM. Der Fokus liegt insbesondere auf der Bildqualität und Auflösung beider Systeme.

Bei der Analyse der Aufnahmen des Leica-Geräts wird eine hohe Auflösung und eine gute Bildqualität festgestellt. Die Bilder zeichnen sich durch Klarheit und präzise Details aus. Im Kontrast dazu zeigen die Aufnahmen des LSRM eine gewisse Unschärfe und eine geringere Auflösung. Die Strukturen erscheinen weniger scharf und es fehlt an subtilen Feinheiten. Trotz dieser Unterschiede war es dennoch möglich, ähnliche Informationen aus beiden Systemen zu extrahieren, wenn auch mit variierender Qualität.

Die Unschärfe der Aufnahmen könnte auf technische Einschränkungen oder unzureichende Justage zurückzuführen sein. Es sollte beachtet werden, dass selbstgebaute Systeme stark von der Erfahrung und dem technischen Wissen des Erbauers abhängen. Eine optimale Bildqualität und Auflösung erfordern daher möglicherweise eine feinere Abstimmung und eine gezielte Optimierung des Systems.

Im Vergleich dazu bieten kommerzielle Lichtblattemikroskope oft eine ausgefeilte Optik und Bildgebungstechnologie, die eine hohe Auflösung und präzise Bildrekonstruktion gewährleisten. Sie wurden speziell für den professionellen Einsatz entwickelt und durch umfangreiche Forschung und Entwicklung optimiert. Dies führt zu gestochen scharfen Bildern mit herausragender Detailgenauigkeit. Die kommerziellen Geräte ermöglichen eine sofortige Einsatzbereitschaft und liefern zuverlässige Ergebnisse.

Trotz der Unterschiede in der Bildqualität und Auflösung bietet das LSRM bereits jetzt die Möglichkeit, zusätzliche Informationen zu generieren, die mit dem Leica-Gerät nicht erfasst werden können. Das LSRM zeichnet sich durch seine Flexibilität und Anpassungsfähigkeit aus. Es ermöglicht eine Vielzahl von Einstellmöglichkeiten und Modi, um verschiedene Aspekte der Probe zu erfassen. Dadurch können umfangreiche Daten gesammelt werden, die

eine detaillierte Analyse und Interpretation ermöglichen. Das LSRM ist in der Lage, spezifische molekulare Informationen über die Probe zu liefern, die mit dem Leica-Gerät nicht erfasst werden können. Diese zusätzlichen Informationen können neue Erkenntnisse und Ansätze in der Forschung ermöglichen.

Ein weiterer Vorteil des LSRM gegenüber kommerziellen Systemen liegt in seiner Flexibilität und Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Anwendung. Durch die Möglichkeit, verschiedene Parameter einzustellen und anzupassen, kann das LSRM für spezifische Forschungsfragen und Experimente optimiert werden. Es eröffnet somit ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten und ermöglicht die Untersuchung verschiedener Probenarten und Fragestellungen. Zudem ist die Probenpräparation sehr einfach. Im Gegensatz dazu erfordert das kommerzielle Lichtscheibenmikroskop Leica SP8 DLS eine aufwendige Probenpräparation und bietet ausschließlich die Möglichkeit, Fluoreszenzbilder zu generieren. Es gibt keine käuflich erwerblichen Lichtscheibenmikroskope, die eine Kombination aus Rayleigh-, Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie bieten. Die meisten kommerziellen Geräte, wie zum Beispiel das SPIMSCI von Luxendo oder das als Referenzgerät dienende SP8 DLS von Leica, kombinieren Fluoreszenz-Spektroskopie mit klassischer konfokaler Mikroskopie. Diese Geräte konzentrieren sich hauptsächlich auf die Fluoreszenz-Bildgebung und bieten eine breite Palette an fluoreszenzspezifischen Techniken und Anwendungen.

Ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung von kommerziellen Lichtscheibenmikroskopen ist der Support und die Zuverlässigkeit des Systems. Die Hersteller der kommerziellen Geräte bieten in der Regel umfassenden technischen Support und können bei auftretenden Problemen oder Fragen unterstützen. Beim LSRM-Prototyp ist der Support begrenzt, da keine spezifische Herstellerunterstützung vorhanden ist. Bei Fehlfunktionen oder fehlerhaften Teilen können unterschiedliche Hersteller involviert sein, die möglicherweise unterschiedliche Anforderungen an den Kundenservice stellen. Die Zuverlässigkeit des LSRM wird maßgeblich von den individuellen Fähigkeiten und den verfügbaren Ressourcen des Erbauers beeinflusst. Bisherige Messungen zeigen jedoch keine offensichtlichen Zuverlässigkeitsprobleme. Die langfristige Zuverlässigkeit und der Support des LSRM müssen jedoch weiter untersucht werden.

Schließlich ist der Kosten- und Budgetaspekt zu berücksichtigen. Das kommerzielle Leica-Gerät verlangt Anschaffungsinvestitionen im mittleren sechsstelligen Bereich, was für viele Institutionen eine erhebliche finanzielle Herausforderung darstellen kann. Zusätzlich könnten bei einem möglichen Ausfall des Geräts erhebliche zusätzliche Kosten entstehen. Das LSRM hingegen kann zu einem vergleichsweise günstigeren Preis aufgebaut werden, der im hohen fünfstelligen Bereich liegt. Es basiert auf einem Open-Source-Ansatz und ermöglicht es Forschern, ihre eigenen Systeme zu konstruieren und anzupassen. Es ist jedoch zu beachten,

dass der Aufbau eines solchen Systems mit erheblichem Zeitaufwand und Investitionen in technisches Wissen verbunden sein kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das LSRM im Vergleich zum Leica-System eine geringere Bildqualität und Auflösung aufweist. Dies kann jedoch durch seine Flexibilität und Anpassungsfähigkeit ausgeglichen werden. Das LSRM bietet bereits jetzt die Möglichkeit, zusätzliche Informationen zu generieren, die mit dem Leica-Gerät nicht erfasst werden können. Es ermöglicht eine breite Anpassung an verschiedene Anwendungen und eröffnet neue Forschungsperspektiven. Die Qualität des Supports und die Verlässlichkeit des LSRM sind stark bedingt durch die individuellen Kompetenzen und die vorhandenen Ressourcen desjenigen, der das System entwickelt hat. In Bezug auf Kosten und Budget bietet das LSRM eine kostengünstigere Alternative zu kommerziellen Systemen. Es erfordert jedoch einen gewissen Aufwand in Bezug auf den Aufbau und die Optimierung des Systems.

4.3 Einsatzfähigkeit im Forschungslabor und im klinischen Umfeld

Eine herausfordernde Aufgabe besteht darin, die erfassten Daten des LSRM in andere bildgebende Verfahren zu integrieren, um umfassende dreidimensionale Informationen zu erhalten. Bei erfolgreicher Umsetzung dieser Strategie besteht die Möglichkeit, die Datensätze des LSRM mit denen anderer dreidimensionaler Bildgebungsmethoden zu integrieren. Die Integration mit der Massenspektrometrie eröffnet neue Möglichkeiten, um detaillierte Einblicke in biologische Prozesse zu gewinnen. Ebenso wäre eine mögliche Synergie mit handelsüblichen, fluoreszenzbasierten Lichtscheibenmikroskopen denkbar, um Bereiche mit erhöhtem C-H-Verbindungsgehalt zu identifizieren, die keiner Fluorophor-Markierung bedürfen. Dies ermöglicht die Durchführung von Fluoreszenzmessungen mit mehreren Farbstoffen, ohne dabei Informationen zu verlieren. Zusätzlich können dadurch weitere Erkenntnisse über die zelluläre Zusammensetzung und die Verteilung von Wirkstoffen gewonnen werden. Eine besondere Stärke des LSRM liegt in seiner Fähigkeit, Proben schnell und präzise zu vermessen, ohne aufwändige Probenpräparationstechniken wie Clearing oder Immunhistochemie anwenden zu müssen. Die Kombination von Fluoreszenz- und Raman-Signalen ermöglicht die Umsetzung bisher unbekannter Kombinationen und Analysemethoden. Im klinischen Umfeld kann das LSRM zur schnellen Bewertung von Krankheitsbildern eingesetzt werden und somit die Überwachung von Medikamentenstudien, die Untersuchung der Antikörperbildung oder das Wachstum von Co-Kulturen erleichtern. Voraussetzung dafür sind optimierte Messparameter und eine Weiterentwicklung des Probenhandlings.

4.4 Schlussfolgerung

Das entwickelte LSRM mit den kombinierten Modalitäten Rayleigh, Fluoreszenz und Raman präsentiert eine vielversprechende Methode zur Erstellung von dreidimensionalen Bildern von 3D-Zellkulturen. Durch die Kombination verschiedener Modalitäten können sowohl Informationen über die molekulare Zusammensetzung als auch morphologische Unterschiede differenziert dargestellt werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur umfassenden Charakterisierung von Proben.

Trotz des Potenzials des LSRM, konventionelle kommerziell erhältliche Geräte in Bezug auf Informationsgewinnung zu übertreffen, sind verschiedene Schwachstellen in den einzelnen Komponenten des Systems vorhanden. Die gegenwärtige Konfiguration der Komponenten zeigt zwar bemerkenswerte Leistungen unter den gegebenen Parametern, jedoch ist eine weitere Optimierung der Komponenten unerlässlich, um die Gesamtleistung des Systems zu steigern. Die Qualität der erzeugten Bilder entspricht derzeit nicht dem Standard kommerzieller Geräte. Dennoch können bereits aus diesen Bildern relevante Informationen extrahiert werden. Eine zukünftige Weiterentwicklung im Bereich der Bildverarbeitung ist daher dringend empfohlen, um die Bildqualität zu verbessern und eine präzisere Datenanalyse zu ermöglichen. Ein bedeutender Vorteil des LSRM im Vergleich zu kommerziellen Geräten liegt in der vereinfachten Handhabung der Proben, wodurch ihre Integrität gewahrt bleibt. Dadurch können Informationen gewonnen werden, die bei anderen Prozessen wie dem Clearing verloren gehen könnten. Zudem bietet das LSRM eine breite Palette an Messmethoden, was als weiterer positiver Aspekt zu betrachten ist.

4.5 Ausblick

Im Hinblick auf die Optimierungsmöglichkeiten des bestehenden Systems in Bezug auf die Bildqualität eröffnen sich verschiedene vielversprechende Ansätze. Eine Möglichkeit zur Steigerung des Signalpegels besteht durch den Einsatz eines zusätzlichen Lasers mit einer kürzeren spezifischen Wellenlänge, beispielsweise 532 nm. Da der Raman-Effekt mit der vierten Potenz der abnehmenden Wellenlänge zunimmt, führt dies zu einem deutlichen Signalgewinn. Es ist jedoch zu beachten, dass biologisches Gewebe grünes Licht absorbiert, weshalb die genaue Absorptionsstatistik der gewählten Probe bei diesem Schritt berücksichtigt werden sollte. Eine alternative Möglichkeit zur Signalverstärkung ist der Wechsel von einer sCMOS-Kamera zu einem Bildverstärker. Dies erhöht die Sensitivität des Systems deutlich. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei dieser Wahl die Auflösung drastisch abnimmt. Eine genaue Abwägung zwischen Sensitivität und Auflösung ist daher erforderlich, um die besten Ergebnisse für die spezifischen Anforderungen der Untersuchungen zu erzielen.

Auf dem Gebiet der Bildverarbeitung gibt es beträchtliches Potenzial zur Optimierung. Durch die Anwendung eines optimierten Berechnungsverfahrens und verschiedener Filter besteht

die Möglichkeit, zusätzliche Informationen zur Molekülzusammensetzung von Proben zu generieren. Die Realisierung dieses Vorhabens ist mittels der Analyse des erzeugten Bildes anhand von Referenzkurven umsetzbar. Die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Molekülzusammensetzung von Proben kann durch die Optimierung der Berechnungsmethoden, den Einsatz fortschrittlicher Filtertechniken und die Einbindung von Referenzkurven oder Modalitätsunterschieden ermöglicht werden. Weiterhin ist es möglich zusätzliche Verbesserungen durch die Optimierung des 3D-Modells zu erzielen. Dies umfasst die Verfeinerung der Algorithmen und die Berücksichtigung von Einflussfaktoren wie Streuung und Rauschen, um eine präzisere Darstellung der Probenstruktur zu erreichen.

Weiterhin stellt eine Integration der vorhandenen Bilder in bereits etablierte medizinische Prozesse eine bedeutende Perspektive dar. Hierbei können die Datenformate angepasst und Schnittstellen entwickelt werden, um eine nahtlose Integration in bestehende medizinische Bildgebungs- und Diagnoseverfahren zu ermöglichen.

Um die Effizienz des Systems zu erhöhen, ist es essenziell, den Arbeitsablauf zu optimieren. Dies kann durch die Einführung automatisierter Prozesse, eine vereinfachte Benutzeroberfläche und die Integration von Echtzeitüberwachung sowie Feedback-Mechanismen erreicht werden. Zeit und Ressourcen sind durch diese Maßnahmen einsparbar und steigern Produktivität des Systems deutlich.

Die Erweiterung des Probenportfolios eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten für das System. Durch die Integration verschiedener Probenarten wie beispielsweise Gewebeschnitte oder andere Probearten erhöht sich die Vielseitigkeit des Systems, sodass es auf eine breitere Palette von Forschungsbereichen angewendet werden kann. Dies ermöglicht eine verstärkte Zusammenarbeit und einen intensiveren Erfahrungsaustausch innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft. Die Ermöglichung von Life Cell Imaging, bei dem die Flüssigkeit in der Kammer kontrolliert ausgetauscht wird, eröffnet neue Perspektiven für die Untersuchung dynamischer Zellprozesse. Diese Methode erlaubt es, Reaktionen und Veränderungen unter physiologischen Bedingungen in Echtzeit zu beobachten. Dadurch erweitert sich das Anwendungsspektrum des Systems erheblich und es bietet sich die Möglichkeit, komplexe biologische Prozesse genauer zu erforschen.

Eine weitere vielversprechende Weiterentwicklung des Systems liegt in der Gestaltung eines Probenhalters mit einem Array, das mehrere Kammern umfasst. Durch die Integration mehrerer Probenkammern ist es möglich, eine parallele Analyse verschiedener Proben zu ermöglichen. Dies steigert die Effizienz der Untersuchungen und bietet die Möglichkeit, mehrere Experimente gleichzeitig durchzuführen.

Auch der Umbau auf ein vollständig neues Probenkammersystem bietet weitere Möglichkeiten zur Verbesserung. So kann die Wasserimmersionskammer durch eine Luftkammer ersetzt werden und die Verwendung von standardisierten Glasobjektträgern ermöglichen. Dies hat

den Vorteil, das Probenhandling zu erleichtern und eine verbesserte Bildgebung zu ermöglichen. Dies ermöglicht die Analyse von vollständig unterschiedliche Proben, wie zum Beispiel Gewebeschnitte. Die Verwendung von Glasobjektträgern als Standard in nahezu jeder Laboreinrichtung erleichtert erheblich sowohl das Handling der Proben als auch die Anwendung des LSM.

Eine fortgeschrittene Automatisierungsmöglichkeit besteht in der Verbindung der Steuer- mit der Datenauswertesoftware, um einen vollständig automatisierten Ablauf zu ermöglichen. Durch die Integration beider Softwarekomponenten könnten Daten nahtlos zwischen verschiedenen Tools ausgetauscht und automatisierte Auswertungen durchgeführt werden. Dadurch wird die Effizienz der Datenverarbeitung und -analyse deutlich erhöht. Eine weitere vielversprechende Entwicklungsmöglichkeit besteht in der Implementierung einer Künstlichen Intelligenz (KI) zur automatischen Zellkulturerkennung. Durch den Einsatz von maschinellem Lernen und Bildanalysealgorithmen kann eine KI entwickelt werden, die in der Lage ist, Zellkulturen automatisch zu identifizieren und zu analysieren. Dies reduziert den manuellen Aufwand erheblich, verbessert die Zuverlässigkeit der Ergebnisse und steigert die Produktivität des Systems. Darüber hinaus kann die KI mit automatischen Rayleigh-Messungen kombiniert werden, um eine effektive Qualitätskontrolle der Proben zu gewährleisten. Wenn die Implementierung der Automatisierung erfolgreich ist, würde dies für den Nutzer eine erhebliche Erleichterung bedeuten, da nur noch die Probe in das Mikroskop eingelegt werden müsste. Zusammenfassend bieten die vorgestellten Optimierungsmöglichkeiten ein breites Spektrum an Ansätzen zur weiteren Verbesserung und Weiterentwicklung des bestehenden Systems. Die Verbesserung der Bildqualität, die Integration in medizinische Prozesse, die Workflow-Optimierung, die Erweiterung des Probenportfolios, das Life Cell Imaging, die Entwicklung eines Probenhalters mit mehreren Kammern, der Umbau der Probenkammer inklusive der Verwendung von standardisierten Glasobjektträgern, die Verbindung von Datenaufnahmesoftware mit Datenauswertesoftware und die Implementierung einer KI zur automatischen Probenerkennung mit integrierter Qualitätskontrolle stellen nur einige der vielversprechenden Perspektiven des LSM dar. Die Umsetzung dieser Entwicklungen steigert die Leistungsfähigkeit des Systems, erschließt neue Anwendungsbereiche und leistet einen wertvollen Beitrag zur wissenschaftlichen Forschung.

5 Zusammenfassung

In der rapide fortschreitenden Landschaft der medizinischen Forschung manifestieren sich kontinuierlich bemerkenswerte Innovationen. Insbesondere die Möglichkeit der Analyse von dreidimensionalen Zellkulturen, die eine authentische und räumliche Reproduktion komplexer zellulärer Strukturen ermöglichen, stellt einen bedeutenden Meilenstein dar. Diese innovative Dimension erlaubt die präzisere Untersuchung räumlicher Gefüge sowie intrazellulärer Abläufe. Um dieses Potential effizient zu erschließen, bedarf es jedoch adäquater Analysemethoden. Unter diesen Methoden erlangt die Lichtscheibenmikroskopie, die konventionell in Verbindung mit dem Fluoreszenz-Effekt eingesetzt wird, zunehmende Bedeutung. Die Verschmelzung eines fluoreszenzbasierten Lichtscheibenmikroskops mit der Raman-Spektroskopie verleiht dieser Methode eine erhöhte Anwendbarkeit im Kontext dreidimensionaler Zellkulturen und ermöglicht eine schonende, nichtinvasive Abbildung der strukturellen Gegebenheiten innerhalb der zellulären Matrix.

Die Konstruktion eines solch komplexen Geräts ist maßgeblich von der präzisen Selektion und Integration einzelner Komponenten geprägt. Durch die Implementierung zweier koaxial ausgerichteter Laserquellen wird eine breitbandige Anwendung im optischen Spektrum ermöglicht. Der Einsatz eines akusto-optischen durchstimmbaren Filters mit enger Bandbreite und hoher Wiederholgenauigkeit gestattet eine präzise Isolation der Signale spezifischer Moleküle. Dank geringer Lichtblattstärken und einer präzisen Verfahrensgenauigkeit der Bewegungsachsen können auch mikroskopisch präzise Schnitte erfasst und gezielt angefahren werden. Ein weiterer Fortschritt ergibt sich durch die Anwendung von hochwertigen optischen Komponenten und elektronischen Komponenten, wie beispielsweise eine Kamera, die ein großflächiges Abbildungsgebiet ermöglicht und den gesamten Zellquerschnitt vollumfänglich darstellen kann. Die intrinsische Stabilität der individuellen Gerätekomponentensichert eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

In Bezug auf die gewählte Zellkultur hat sich besonders die Ko-Kultur aus HT29-Zellen und Fibroblasten bewährt. Dieses Modell dient als etablierte Standardreferenz und ermöglicht einen robusten Vergleich mit Referenzgeräten. Dadurch wird die angemessene Validierung des LSM gewährleistet. Vergleichende Untersuchungen zwischen den verschiedenen Modalitäten erbringen unterschiedliche Ergebnisse, insbesondere hinsichtlich der Charakterisierung von C-H-Verbindungen, wie sie beispielsweise im Kollagen vorkommen. Dies unterstreicht den Mehrwert der multimodalen Visualisierung durch das entwickelte Instrument.

Die Implementierung der einzelnen Modalitäten innerhalb des dreidimensionalen Modells offenbart differenzierte Bereiche mit variierenden Intensitätsverteilungen, die auf spezifische Molekülansammlungen zurückzuführen sind. Technisch betrachtet etabliert sich das entwickelte System als funktionsfähig, jedoch bedarf es noch weiterer Optimierungen an bekannten Engstellen. Trotz dieser Aspekte kann das System bereits im klinischen Umfeld Anwendung finden, besonders in Synergie mit anderen Geräten wie Massenspektrometern. Ebenso eröffnet es die Möglichkeit zur Untersuchung von Zellkulturen ohne Beeinflussung biochemischer Prozesse, wodurch anfängliche Erkenntnisse gewonnen werden können, während potenziell störende Verfahren wie das "Clearing" vermieden werden.

Zusammengefasst lässt sich festgestellt, dass die Integration verschiedener Modalitäten die Möglichkeit bietet, Einblicke sowohl in die molekulare Zusammensetzung als auch in morphologische Unterschiede zu gewähren. Dies eröffnet neue Perspektiven für eine umfassende Charakterisierung von Proben. Dennoch ist es unbestreitbar, dass die kontinuierliche Weiterentwicklung des vorgestellten Lichtscheiben-Raman-Mikroskops notwendig ist, um bestehende Schwachstellen zu beheben.

6 Literaturverzeichnis

1. Eckart WU: *Geschichte der Medizin*. 5. Aufl., Berlin, Heidelberg, Springer, 2005.
2. Aschoff L, Diepgen P: *Kurze Übersichtstabelle zur Geschichte der Medizin*. 6. Aufl., Berlin, Heidelberg, Springer, 2013.
3. Seidler E, Leven KH: *Geschichte der Medizin und der Krankenpflege*. 7. Aufl. Stuttgart, Kohlhammer, 2003.
4. Maul S, Westendorf W: Erste Medizinkonzepte zwischen Magie und Vernunft. In: *Die Chronik der Medizin*, Hrsg. Schott H, Dortmund, Chronik. 1933, 16–33.
5. Hughes JT: The Edwin Smith Surgical Papyrus: An Analysis of the first case reports of spinal cord injuries. *Paraplegia* 26: 71-82, 1988.
6. Van Middendorp JJ, Sanchez GM, Burrige AL: The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur. Spine J.* 19 (11): 1815–23, 2010. doi:10.1007/s00586-010-1523-6
7. Schubert C: Griechenland und die europäische Medizin. In: *Die Chronik der Medizin*, Hrsg. Schott H, Dortmund, Chronik. 1993, S. 34–35.
8. Rechenauer G: *Thukydides und die hippokratische Medizin : Naturwissenschaftliche Methodik als Modell für Geschichtsdeutung*. Hildesheim, Zürich, New York, Georg Olms, 1991.
9. Galib, Barve M, Mashru M, Jagtap C, Patgiri BJ, Prajapati PK: Therapeutic potentials of metals in ancient India: A review through Charaka Samhita. *J. Ayurveda Integr. Med.* 2 (2): 55–63, 2011. doi:10.4103/0975-9476.82523
10. Meulenbeld, GJ: *A history of Indian medical literature*. Groningen, Forsten, 1999.
11. Zufferey FA: Asepsis und Narkose : Der Einfluss der arabischen Medizin auf die westliche Welt. *Etü* 2011(1): 16-9, 2011.
12. Shamsi M, Haghverdi F, Changizi-Ashtiyani S: A brief review of Rhazes, Avicenna, and Jorjani's views on diagnosis of diseases through urine examination. *Iran. J. Kidney Dis.* 8 (4): 278–85, 2014.
13. Azizi MH: The otorhinolaryngologic concepts as viewed by Rhazes and Avicenna. *Arch. Iranian Med.* 10 (4): 552–5, 2007.
14. Siraisi NG: *Medieval and Early Renaissance Medicine. An Introduction to Knowledge and Practice*. 2. Aufl. Chicago, The University of Chicago Press, 1990.
15. Benini A, Bonar, SK: Andreas Vesalius 1514-1564. *Spine* 21(11); 1388–93,1996. doi:10.1097/00007632-199606010-00024

16. Garrison DH, Hast MH: Andreas Vesalius on the larynx and hyoid bone: an annotated translation from the 1543 and 1555 editions of *De humani corporis fabrica*. *Med. Hist.* 37 (1), 3–36, 1993. doi:10.1017/S0025727300057665
17. Sette P, Dorizzi RM, Azzini AM: Vascular Access: An Historical Perspective from Sir William Harvey to the 1956 Nobel Prize to André F. Cournand, Werner Forssmann, and Dickinson W. Richards. *J. Vasc. Access.* 13(2): 137–44, 2012 doi:10.5301/jva.5000018
18. Ribatti D: William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. *J. Angiogenes. Res.* 1 (3): 2009. doi:10.1186/2040-2384-1-3
19. Pagel W: William Harvey and the purpose of circulation. *Isis* 42(1): 22–38, 1951.
20. Riedel, Stefan: Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)* 18 (1): 21–25, 2005. doi:10.1080/08998280.2005.11928028
21. Schwartz M: The life and works of Louis Pasteur. *J. Appl. Microbiol.* 91 (4): 597–601, 2001. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01495.x
22. Bordenave, G: Louis Pasteur (1822-1895). *Microbes & infection* 5 (6): 553–60, 2003. doi:10.1016/S1286-4579(03)00075-3
23. Petermann H, Nemes C: Die Entdeckung und Entwicklung der Anästhesie im 19. Jahrhundert. In: *50 Jahre Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin*. Hrsg. Schüttler J, Berlin, Heidelberg, Springer. 2003, S. 2–26. doi:10.1007/978-3-642-18198-6_1
24. Schulte am Esch J, Goerig M: Die Entwicklung der Anästhesie nach 1945. In: *50 Jahre Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin*. Hrsg. Schüttler J, Berlin, Heidelberg, Springer. 2003, S. 182–231. doi:10.1007/978-3-642-18198-6_9
25. Pitt D, Aubin JM: Joseph Lister: father of modern surgery. *Can. J. Surg.* 55 (5): E8-9, 2012. doi:10.1503/cjs.007112
26. Worboys M: Joseph Lister and the performance of antiseptic surgery. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* 67 (3): 199–209, 2013. doi:10.1098/rsnr.2013.0028
27. Fleming A: Penicillin. *Br. Med. J.* 2 (4210): 386, 1941.
28. Bennett JW, Chung KT, Bennett JW, Chung KT: Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Adv. Appl. Microbiol.* 49: 163–84, 2001. doi:10.1016/S0065-2164(01)49013-7
29. Glasser O: *Wilhelm Conrad Röntgen und die Geschichte der Röntgenstrahlen*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg, Springer, 1995.
30. Danylova TV, Komisarenko SV: Standing on the shoulders of giants: James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin and the birth of molecular biology. *Ukr. Biochem. J.* 92 (4): 154–65, 2020. doi:10.15407/ubj92.04.154

31. Watson JD, Crick FH: The structure of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 18: 123–31, 1953. doi:10.1101/SQB.1953.018.01.020
32. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Zhu X et al.: The sequence of the human genome. *Sci.* 291 (5507): 1304–51, 2001. doi:10.1126/science.1058040
33. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML: Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2: 403–30, 2011. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257
34. Haycock JW: 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol. Biol.* 695: 1–15, 2011. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0_1
35. Huang X, Huang Z, Gao W, Gao W, He R, Li Y, Crawford R, Zhou Y, Xiao L, Xiao Y: Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems. *Gels (Basel)* 8 (12): 829, 2022. doi:10.3390/gels8120829
36. Justice BA, Badr NA, Felder RA: 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov. Today* 14 (1-2): 102–7, 2009. doi:10.1016/j.drudis.2008.11.006
37. Delle Cave D, Rizzo R, Sainz B, Gigli G, Del Mercato LL, Lonardo E: The Revolutionary Roads to Study Cell-Cell Interactions in 3D In Vitro Pancreatic Cancer Models. *Cancers (Basel)* 13 (4): 930, 2021. doi:10.3390/cancers13040930
38. Van Duinen V, Trietsch S, Joore J, Vulto P, Hankemeier T: Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr. Opin. biotechnol.* (35): 118–26, 2015. doi:10.1016/j.copbio.2015.05.002
39. Dutta D, Heo I, Clevers H: Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol. Med.* 23(5): 393–410, 2017. doi:10.1016/j.molmed.2017.02.007
40. Liu Y, Chen YG: 2D- and 3D-Based Intestinal Stem Cell Cultures for Personalized Medicine. *Cells* 7 (12): 225, 2018. doi:10.3390/cells7120225
41. Esparza-López J, Martínez-Aguilar JF, Ibarra-Sánchez M: Deriving primary Cancer Cell Cultures for personalized Therapy. *Rev. Invest. Clin.* 71 (6): 369–80, 2019. doi:10.24875/ric.19002832
42. Law A, La Rodriguez de Fuente L, Grundy TJ, Fang G, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D: Advancements in 3D Cell Culture Systems for Personalizing Anti-Cancer Therapies. *Front. Oncol.* 11: 782766, 2021. doi:10.3389/fonc.2021.782766
43. Jedrzejczak-Silicka M: History of Cell Culture. In: *New Insights into Cell Culture Technology*. Hrsg. Gowder SJ, Rijeka, InTech. 2017, S. 1–41. doi:10.5772/66905
44. Abbott A: Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424 (6951): 870–2, 2003. doi:10.1038/424870a

45. Knight E, Przyborski S: Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J. Anat.* 227 (6): 746–56, 2014. doi:10.1111/joa.12257
46. Park Y, Huh KM, Kang SW: Applications of Biomaterials in 3D Cell Culture and Contributions of 3D Cell Culture to Drug Development and Basic Biomedical Research. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (5): 2491, 2021. doi:10.3390/ijms22052491
47. Wang PY, Thissen H, Kingshott P: Modulation of human multipotent and pluripotent stem cells using surface nanopographies and surface-immobilised bioactive signals: A review. *Acta Biomater.* 45: 31–59, 2016. doi:10.1016/j.actbio.2016.08.054
48. Caleb J, Yong T: Is it Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cultures? *Front. Mol. Biosci.* 7(33): 2020. doi:10.3389/fmolb.2020.00033
49. Duval K, Grover H, Han L, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg JJ, Chen Z: Modeling Physiological Events In 2d Vs. 3d Cell Culture. *Physiol.* 4(32): 266–77, 2017. doi:10.1152/physiol.00036.2016
50. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K: 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.* 14 (4): 910–9, 2018. doi:10.5114/aoms.2016.63743
51. Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A, Blanco A, Byrne HJ: Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *In Vitro Toxicol.* 29 (1): 124–31, 2015. doi:10.1016/j.tiv.2014.09.014
52. Schmid J, Schwarz S, Meier-Staude R, Sudhop S, Clausen-Schaumann H, Schieker M, Huber R: A Perfusion Bioreactor System for Cell Seeding and Oxygen-Controlled Cultivation of Three-Dimensional Cell Cultures. *Tissue Eng. Part C Methods* 24 (10): 585–95, 2018. doi:10.1089/ten.tec.2018.0204
53. Tehranirokh M, Kouzani AZ, Francis PS, Kanwar JR: Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. *Biomicrofluidics* 7 (5): 51502, 2013. doi:10.1063/1.4826935
54. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, Burkhardt B, Martínez Sánchez JJ, Ladurner R, Thasler W, Damm G, Nussler A: 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays (Basel)* 4 (1): 64–83, 2015. doi:10.3390/microarrays4010064
55. Fontoura J, Viezzer C, Dos Santos F, Ligabue R, Weinlich R, Puga R, Antonow D, Severino P, Bonorino C: Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Mater. Sci. Eng. C* 107: 110264, 2020. doi:10.1016/j.msec.2019.110264
56. Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L: Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J. Cell. Physiol.* 233 (4): 2993–3003, 2018. doi:10.1002/jcp.26052

57. Liu Y, Gill E, Shery H, Yan Y: Microfluidic on-chip biomimicry for 3D cell culture: a fit-for-purpose investigation from the end user standpoint. *Future Sci. OA* 3 (2): FSO173, 2017. doi:10.4155/fsoa-2016-0084
58. Tibbitt MW, Anseth KS: Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 103 (4): 655–63, 2009. doi:10.1002/bit.22361
59. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC: Introduction to confocal microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 132 (12): P1-5, 2012. doi:10.1038/jid.2012.429
60. Sanderson J: Multi-Photon Microscopy. *Curr. Proto.* 3 (1): e634, 2023. doi:10.1002/cpz1.634
61. Schmitt JM: Optical coherence tomography (OCT): a review. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 5 (4): 1205–15, 1998. doi:10.1109/2944.796348
62. Goodhew PJ, Humphreys J: *Electron Microscopy and Analysis*. 3. Aufl. London, CRC Press, 2000.
63. Hoenger A, Bouchet-Marquis C: Cellular tomography. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 82: 67–90, 2011. doi:10.1016/B978-0-12-386507-6.00003-8
64. Weber M, Huisken J: Light sheet microscopy for real-time developmental biology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21 (5): 566–72, 2011. doi:10.1016/j.gde.2011.09.009
65. Weber M, Mickoleit M, Huisken J: Light sheet microscopy. *Methods Cell Biol.* 123: 193–215, 2014. doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00011-2
66. Olarte O, Andilla J, Gualda E, Loza-Alvarez P: Light-sheet microscopy: a tutorial. *Adv. Opt. Photonics* 10 (1): 111, 2018. doi:10.1364/AOP.10.000111
67. Girkin JM, Carvalho MT: The light-sheet microscopy revolution. *J. Opt.* 20 (5): 53002, 2018. doi:10.1088/2040-8986/aab58a
68. Pampaloni F, Ansari N, Stelzer E: High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res.* 352 (1): 161–77, 2013. doi:10.1007/s00441-013-1589-7
69. Stelzer E, Strobl F, Chang BJ, Preusser F, Preibisch S, McDole K, Fiolka R: Light sheet fluorescence microscopy. *Nat. Rev. Methods Primers* 1 (73): 2021. doi:10.1038/s43586-021-00069-4
70. Teledyne Photometrics (2017): Introduction To Light Sheet Microscopy. Online verfügbar unter <https://www.photometrics.com/learn/light-sheet-microscopy/introduction-to-light-sheet-microscopy> (angerufen am 04.07.2023).

71. Allen J (2023): Light Sheet Fluorescence Microscopy. Online verfügbar unter <https://www.microscopyu.com/techniques/light-sheet/light-sheet-fluorescence-microscopy> (abgerufen am 07.07.2023)
72. Nyquist H: Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *Proc. IEEE* 90 (2): 617-44, 2002. doi:10.1109/5.989875
73. Goldys EM: *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J., Wiley-Blackwell, 2009.
74. Thaeer AA, Sernetz M: *Fluorescence Techniques in Cell Biology*. Berlin, Heidelberg, Springer, 1973.
75. Lichtman JW, Conchello JA: Fluorescence microscopy. *Nat. methods* 2 (12): 910–19, 2005. doi:10.1038/nmeth817
76. Berland K: Basics of Fluorescence. In: *Methods in Cellular Imaging*. Hrsg. Periasamy A, New York, Springer. 2001, S. 5–19. doi:10.1007/978-1-4614-7513-2_1
77. Šípoš R, Šima J: Jablonski Diagram Revisited. *Rev. Cuba. De Fis.* 37 (2): 125–30, 2020.
78. Hof M, Macháň R: Basics of Optical Spectroscopy: In: *Handbook of spectroscopy*, Hrsg. Gauglitz G, Moore DS, Weinheim, Wiley-VCH. 2014, S. 31-38.
79. Berezin MY, Achilefu S: Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.* 110 (5): 2641–84, 2010. doi:10.1021/cr900343z.
80. Kim D, Park SY: Multicolor Fluorescence Photoswitching: Color-Correlated versus Color-Specific Switching. *Adv. Opt. Mater.* 6 (20): 1800678, 2018. doi:10.1002/adom.201800678
81. Krisp H: Neue korrelative mikroskopische Methoden zur ultrastrukturellen Lokalisation von green fluorescent protein und Proteinkinase D2 in kultivierten humanen Pankreas-Karzinoidzellen. Open Access Repositorium der Universität Ulm und Technischen Hochschule Ulm, Dissertation, 2010. doi:10.18725/OPARU-2010
82. Song LM, Banerjee, S, Desilets D, Diehl DL, Farraye FA, Kaul V, Kethu SR, Kwon RS, Mamula P, Pedrosa MC, Rodriguez S, Tierney WM: Autofluorescence imaging. *Gastrointest. Endosc.* 73 (4): 647–50, 2011. doi:10.1016/j.gie.2010.11.006
83. Haug JT, Haug C, Kutschera V, Mayer G, Maas A, Liebau S, Castellani C, Wolfram U, Clarkson EN, Waloszek D: Autofluorescence imaging, an excellent tool for comparative morphology. *J. Microsc.* 244 (3): 259–72, 2011. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03534.x
84. Blacker TS, Duchon MR: Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol Med.* 100: 53–65, 2016. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010

85. Kolenc O, Quinn KP: Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid. Redox Signal.* 30 (6): 875–89, 2019. doi:10.1089/ars.2017.7451
86. Raghavachari N, Bao YP, Li G, Xie X, Müller UR: Reduction of autofluorescence on DNA microarrays and slide surfaces by treatment with sodium borohydride. *Anal. Biochem.* 312 (2): 101–5, 2003. doi:10.1016/S0003-2697(02)00440-2
87. Wold JP, Mielnik M: Nondestructive Assessment of Lipid Oxidation in Minced Poultry Meat by Autofluorescence Spectroscopy. *J. Food Sci.* 65 (1): 87–95, 2000. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb15961.x
88. García-Plazaola JI, Fernández-Marín B, Duke SO, Hernández A, López-Arbeloa F, Becerril JM: Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Sci.* 236: 136–45, 2015. doi:10.1016/j.plantsci.2015.03.010
89. Chen YC, Sood C, Francis AC, Melikyan GB, Dickson RM: Facile autofluorescence suppression enabling tracking of single viruses in live cells. *J. Biol. Chem.* 294 (50): 19111–18, 2019. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010268>
90. Jameson DM: *Introduction to Fluorescence*. 1. Aufl., Boca Raton, CRC Press, 2014.
91. Swinehart DF: The Beer-Lambert Law. *J. Chem. Educ.* 39 (7): 333, 1962. doi:10.1021/ed039p333
92. Icha J, Weber M, Waters JC, Norden C: Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays* 39 (8): 1700003, 2017. doi:10.1002/bies.201700003
93. Klonis N, Rug M, Harper I, Wickham M, Cowman A, Tilley L: Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur. Biophys. J.* 31 (1): 36–51, 2002. doi:10.1007/s00249-001-0202-2
94. Ettinger A, Wittmann T: Fluorescence live cell imaging. *Methods Cell Biol.* 123: 77–94, 2014. doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7.
95. Santi PA: Light sheet fluorescence microscopy: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 59 (2): 129–38, 2011. doi:10.1369/0022155410394857
96. Lauwerends LJ, Abbasi H, Bakker Schut TC, van Driel PB, Hardillo JA, Santos IP, Barroso EM, Koljenović S, Vahrmeijer AL, Baatenburg de Jong RJ, Puppels GJ, Keereweer S: The complementary value of intraoperative fluorescence imaging and Raman spectroscopy for cancer surgery: combining the incompatibles. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 49 (7): 2364–76, 2022. doi:10.1007/s00259-022-05705-z
97. Das Nandan K, Dai Y, Liu P, Hu C, Tong L, Chen X, Smith ZJ: Raman Plus X: Biomedical Applications of Multimodal Raman Spectroscopy. *Sensors (Basel)* 17 (7): 1592, 2017. doi:10.3390/s17071592

-
98. Rao AR, Hanchanale V, Javle P, Karim O, Motiwala H: Spectroscopic view of life and work of the Nobel Laureate Sir C.V. Raman. *J. Endourol.* 21 (1): 8–11, 2007. doi:10.1089/end.2006.9998
99. Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK: Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Res. Lett.* 14 (1): 231, 2019. doi:10.1186/s11671-019-3039-2
100. Miles RB, Lempert WR, Forkey JN: Laser Rayleigh scattering. *Meas. Sci Technol.* 12 (5): R33-R51, 2001. doi:10.1088/0957-0233/12/5/201
101. Devereaux TP, Hackl R: Inelastic light scattering from correlated electrons. *Rev. Mod. Phys.* 79 (1): 175–233, 2007. doi:10.1103/RevModPhys.79.175
102. Hooijschuur JH, Verkaaik MF, Davies GR, Ariese F: Will Raman meet bacteria on Mars? An overview of the optimal Raman spectroscopic techniques for carotenoid biomarkers detection on mineral backgrounds. *Neth. J. Geosci.* 95 (2): 141–51, 2016. doi:10.1017/njg.2015.3
103. Brenig W: Die Maxwell-Boltzmann-Verteilung. In: *Statistische Theorie der Wärme. Springer-Lehrbuch.* Berlin, Heidelberg, Springer. 1996. doi:10.1007/978-3-642-61038-7_7
104. Schulte F: Raman-Spektroskopie als Werkzeug für die Charakterisierung und Klassifizierung von Pollen. Open Access Repository der Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 2010.
105. Howell NK, Arteaga G, Nakai S, Li-Chan EC: Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *J. Agric. Food Chem.* 47 (3): 924–33, 1999. doi:10.1021/jf981074l
106. Li-Chan EC: The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trend Food Sci. Technol.* 7 (11): 361–70, 1996. doi:10.1016/S0924-2244(96)10037-6
107. Tripathi A, Emmons ED, Fountain AW, Guicheteau JA, Moskovits M, Christesen SD: Critical role of adsorption equilibria on the determination of surface-enhanced Raman enhancement. *ACS Nano* 9 (1): 584–93, 2015. doi:10.1021/nn5058936
108. Bhagavantam S, Venkatarayudu T: Raman effect in relation to crystal structure. *Proc. Indian Acad. Sci. (Math. Sci.)* 9: 224–58, 1939. doi:10.1007/BF03046465
109. Ling HY, Pu H, Seaman B: Creating a stable molecular condensate using a generalized Raman adiabatic passage scheme. *Phys. Rev. Lett.* 93 (25): 250403, 2004. doi:10.1103/PhysRevLett.93.250403
110. Jehlička J, Edwards HG: Raman spectroscopy as a tool for the non-destructive identification of organic minerals in the geological record. *Org. Geochem.* 39 (4): 371–86, 2008. doi:10.1016/j.orggeochem.2008.01.005

111. Paudel A, Rajjada D, Rantanen J: Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 89: 3–20, 2015. doi:10.1016/j.addr.2015.04.003
112. Lorenz B, Wichmann C, Stöckel S, Rösch P, Popp J: Cultivation-Free Raman Spectroscopic Investigations of Bacteria. *Trends Microbiol.* 25 (5): 413–24, 2017. doi:10.1016/j.tim.2017.01.002
113. Charwat V, Schütze K, Holnthoner W, Lavrentieva A, Gangnus R, Hofbauer P, Hoffmann C, Angres B, Kasper C: Potential and limitations of microscopy and Raman spectroscopy for live-cell analysis of 3D cell cultures. *J. Biotechnol.* 205: 70–81, 2015. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.02.007
114. Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, Esmonde-White K, Fullwood NJ, Gardner B, Martin-Hirsch PL, Walsh MJ, McAinsh MR, Stone N, Martin FL: Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat. Protoc.* 11 (4): 664–87, 2016. doi:10.1038/nprot.2016.036
115. Graf BW, Boppart SA: Imaging and analysis of three-dimensional cell culture models. *Methods Mol. Biol.* 591: 211–27, 2010. doi:10.1007/978-1-60761-404-3_13
116. Matousek P, Stone N: Emerging concepts in deep Raman spectroscopy of biological tissue. *Analyst* 134 (6): 1058–66, 2009. doi:10.1039/B821100K
117. Kahraman M, Keseroğlu K, Culha M: On sample preparation for surface-enhanced raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra. *Appl. Spectrosc.* 65 (5): 500–6, 2011. doi:10.1366/10-06184
118. Smekal A: Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften* 11 (43): 873–5, 1923. doi:10.1007/BF01576902
119. Haken H, Wolf HC: Raman-Spektren. In: *Molekülphysik und Quantenchemie*. Berlin, Heidelberg, Springer. 1998. Doi:10.1007/978-3-662-08828-9_12
120. Tu Q, Chang C: Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol Med.* 8 (5): 545–58, 2012. doi:10.1016/j.nano.2011.09.013
121. Larkin P: *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. 2. Aufl., Amsterdam, Elsevier, 2018.
122. Uzunbajakava N, Otto C: Combined Raman and continuous-wave-excited two-photon fluorescence cell imaging. *Opt. Lett.* 28 (21): 2073–75, 2003. doi:10.1364/OL.28.002073
123. Müller W, Kielhorn M, Schmitt M, Popp J, Heintzmann R: Light sheet Raman microscopy. *Optica* 3 (4): 452–57, 2016. doi:10.1364/OPTICA.3.000452
124. Rocha-Mendoza I, Licea-Rodriguez J, Marro M, Olarte OE, Plata-Sanchez M, Loza-Alvarez P: Rapid spontaneous Raman light sheet microscopy using cw-lasers and tunable filters. *Biomed. Opt. Express* 6 (9): 3449–61, 2015. doi:10.1364/BOE.6.003449

-
125. Oshima Y, Sato H, Kajiura-Kobayashi H, Kimura T, Naruse K, Nonaka S: Light sheet-excited spontaneous Raman imaging of a living fish by optical sectioning in a wide field Raman microscope. *Opt. Express* 20 (15): 16195-204, 2012. doi:10.1364/OE.20.016195
126. Pitrone P, Schindelin J, Stuyvenberg L, Preibisch S, Weber M, Eliceiri KW, Huisken J, Tomancak P: OpenSPIM: an open-access light-sheet microscopy platform. *Nat. Methods* 10: 598–99, 2013. doi:10.1038/nmeth.2507
127. Manser S, Keck S, Vitacolonna M, Wühler F, Rudolf R, Rädle M: Innovative Imaging Techniques: A conceptual Exploration of Multi-Modal Raman Light Sheet Microscopy. *Micromachines* 14(9): 1739, 2023. doi:10.3390/mi14091739
128. Thorlabs GmbH (2023). Coating Specifications of Broadband Dielectric Mirrors. Typ: EO2 Coating. Online verfügbar unter: https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=139&pn=BB1-E02 (abgerufen am 16.07.2023).
129. Malet A: Kepler and the Telescope. *Ann. Sci.* 60 (2): 107–36, 2003. doi:10.1080/0003379031000080961
130. Kang U: *Fiber optic sensing and imaging*. 1. Aufl., New York, Springer, 2013. doi:10.1007/978-1-4614-7482-1
131. Pendry J: Perfect cylindrical lenses. *Opt. Express* 11 (7): 755–60, 2003. doi:10.1364/OE.11.000755
132. Brimrose Corp. (2021). AOTF Set Up Manual. Technische Dokumentation. Doc-Nr.: SUMan-AO-AOTFIntro-v1.0-20081212. Verfügbar auf Anfrage bei Brimrose Corp.
133. Hamamatsu Corp. (2023). Datenblatt ORCA-Flash4.0 LT PLUS Digital CMOS camera C11440-42U30 for life science. Online verfügbar unter https://www.epfl.ch/research/facilities/ptbiop/wp-content/uploads/2020/01/Hamamatsu_ORCA-Flash4.0.pdf (abgerufen am 14.07.2023).
134. Pudlas M: *Nicht invasive Diagnostik in der Regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie*. 1. Aufl., Stuttgart, Fraunhofer IGB, 2012.
135. Omicron Laserage Laserprodukte GmbH (2023). Specification LuxX plus diode lasers Series. Online verfügbar unter <https://www.omicron-laser.de/english/lasers/diode-lasers/luxx-lasers-/luxx-plus-diode-lasers.html> (abgerufen am 28.06.2023).
136. OpenSPIM Org. (2023). Part List (L-OpenSPIM). Online verfügbar unter https://openspim.org/Table_of_parts (abgerufen am 11.07.2023)
137. Gmelch M, Reineke S: *Durchblick in Optik*. Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum, 2019. doi:10.1007/978-3-662-58939-7
138. Budwig R: Refractive index matching methods for liquid flow investigations. *Exp. Fluids* 17 (5): 350–5, 1994. doi:10.1007/BF01874416

139. Freeman MH, Hull C: *Optics*. 11. Aufl. Edinburgh, New York, Butterworth-Heinemann, 2003.
140. Evident Scientific (2023). Specification UMPLFLN-Objectives 10x/20x. Online verfügbar unter <https://www.olympus-lifescience.com/de/objectives/lumplfln-w/> (abgerufen am 27.07.2023)
141. Picard Industries (2023). Datenblatt USB 4D Stage. Online verfügbar unter <https://picardindustries.com/storage/2022/01/usb-4d-stage.pdf> (abgerufen am 15.07.2023).
142. Thorlabs GmbH (2023). Key Specification 25 mm Motorized Translation Stage PT1-Z8 Standard. Online verfügbar unter: https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?object_group_id=998&pn=PT1/M-Z8 (abgerufen am 16.07.2023).
143. Wilcox C: *Scattering Theory for Diffractive Gratings*. New York, Springer, 1984. doi: 10.1007/978-1-4612-1130-3
144. Denes L, Kaminsky B, Gottlieb M, Metes P: Factors affecting AOTF image quality. In: *Proceedings of the First Army Research Laboratory AOTF Workshop*. Army Research Laboratory Report ARL-SR-54. Adelphi, Army Research Laboratory. 1997, S. 177-188.
145. Pustovoit VI, Pozhar VE: Acoustically-controlled Spectral Optical Instruments. *Phys. Procedia* 70: 783-6, 2015. doi:10.1016/j.phpro.2015.08.267
146. Brimrose Corp. (2023). Specification for AOTF TEAF_-.55-1.0_. Online verfügbar unter: <https://static1.squarespace.com/static/58cd62b759cc688ab46997dd/t/64aec6b7e3b5676ec1a0156c/1689175735576/AOTF.pdf> (abgerufen am 20.07.2023).
147. Holst, G: Die sCMOS-Welle. *Photonik* 1/2012: 28-32, 2012.
148. Fuest F, Barlow RS, Geyer D, Seffrin F, Dreizler A: A hybrid method for data evaluation in 1-D Raman spectroscopy. *Proc. Combust. Inst.* 33 (1): 815–22, 2011. doi:10.1016/j.proci.2010.06.064
149. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU: Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 42 (5): 493–541, 2007. doi:10.1080/05704920701551530
150. Schicks JM, Erzinger J, Ziemann MA: Raman spectra of gas hydrates--differences and analogies to ice 1h and (gas saturated) water. *Spectrochim. Acta – A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 61 (10): 2399–403, 2005. doi:10.1016/j.saa.2005.02.019
151. Tec5 AG (2023). Produktinformation MultiSpec® Pro II Process Software for UV-VIS-NIR and Raman Spectroscopy. Online verfügbar unter https://www.tec5usa.com/wp-content/uploads/2021/06/tec5_3401_PI_MultiSpecPro_II_USLetter_201705.pdf (abgerufen am 09.07.2023).

-
152. Chen TR, Drabkowski D, Hay RJ, Macy M, Peterson W: WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genet. Cytogen.* 27 (1): 125–34, 1987. doi:10.1016/0165-4608(87)90267-6
153. Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC: Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int. J. Cancer* 52 (2): 286–89, 1992. doi:10.1002/ijc.2910520222
154. Agullo G, Gamet-Payrastre L, Fernandez Y, Anciaux N, Demigné C, Rémésy C: Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett.* 105 (1): 61–70, 1996. doi:10.1016/0304-3835(96)04262-0
155. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I: HT29 Cell Line. In: *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Hrsg. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. Cham (CH), Springer. 2015, S. 113-124. doi:10.1007/978-3-319-16104-4_11
156. Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6: 392–401, 2006. doi:10.1038/nrc1877
157. Aung HH, Wang CZ, Ni M, Fishbein A, Mehendale SR, Xie JT, Shoyama AY, Yuan CS: Crocin from *Crocus Sativus* Possesses Significant Anti-Proliferation Effects on Human Colorectal Cancer Cells. *Exp. Oncol.* 29 (3), 175–80, 2007.
158. Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS: Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 62 (24), 7241–46, 2002
159. Park JH, Lee JM, Lee EJ, Kim DJ, Hwang WB: Kynurenine promotes the goblet cell differentiation of HT-29 colon carcinoma cells by modulating Wnt, Notch and AhR signals. *Oncol. Rep.* 39 (4): 1930–8, 2018. doi:10.3892/or.2018.6266
160. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC: Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J. Immunol.* 167 (7): 3545–9, 2001. doi:10.4049/jimmunol.167.7.3545
161. Kim SA, Lee EK, Kuh HJ: Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Exp. Cell Res.* 335 (2): 187–96, 2015. doi:10.1016/j.yexcr.2015.05.016
162. Bouziges F, Simo P, Simon-Assmann P, Haffen K, Kedinger M: Altered deposition of basement-membrane molecules in co-cultures of colonic cancer cells and fibroblasts. *Int. J. Cancer* 48 (1): 101–8, 1991. doi:10.1002/ijc.2910480119
163. Fűri I, Kalmár A, Wichmann B, Spisák S, Schöller A, Barták B, Tulassay Z, Molnár B: Cell Free DNA of Tumor Origin Induces a 'Metastatic' Expression Profile in HT-29 Cancer Cell Line. *PLoS one* 10 (7): e0131699, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0131699

164. Tomer R, Khairy K, Keller PJ: Light sheet Microscopy in Cell Biology. In: *Cell Imaging Techniques. Methods in Molecular Biology*. Hrsg. Taatjes D, Roth J. Vol. 931, Totowa, Humana Press. 2012, S. 123–137. doi:10.1007/978-1-62703-056-4_7
165. Mohan K, Purnapatra SB, Mondal PP: Three Dimensional Fluorescence Imaging Using Multiple Light-Sheet Microscopy. *PloS one* 9 (6): e96551, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0096551
166. Press WH, Teukolsky SA: Savitzky-Golay Smoothing Filters. *Compu. Phys.* 4 (6): 669–72, 1990. doi:10.1063/1.4822961
167. Schafer RW: What Is a Savitzky-Golay Filter? [Lecture Notes]. *IEEE Signal Process. Mag.* 28 (4), 111–7, 2011. doi:10.1109/MSP.2011.941097
168. Bundesamt für Strahlenschutz (2023). Schutzmaßnahmen bei Laseranwendungen. Online verfügbar unter <https://www.bfs.de/DE/themen/opt/anwendung-alltag-technik/laser/schutz/schutz-laser.html> (abgerufen am 09.07.2023)
169. Thorlabs GmbH (2023). Specification and Manual for Scanning-Slit Optical Beam Profiler BP209-VIS/M. Online verfügbar unter: https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=804 (abgerufen am 16.07.2023).
170. Plass W, Maestle R, Wittig K, Voss A, Giesen A: High-resolution knife-edge laser beam profiling. *Opt. Commun.* 134 (1-6): 21–4, 1997. doi:10.1016/S0030-4018(96)00527-5
171. Reeb, W: Silizium-Detektoren der Zukunft. *Phys. J.* 11 (1) : 73-5, 2012.
172. Regehly M: Rauscharme CCD-Kameras für Bildgebung und Spektroskopie. *Optik & Photonik* 9 (3): 36–9, 2014. doi:10.1002/opph.201400057
173. Schettini R, Gasparini F, Corchs S, Marini F, Capra A, Castorina A: Contrast image correction method. *J. Electron. Imaging* 19 (2): 023005, 2010. doi:10.1117/1.3386681
174. Wright CJ, Zhou XD: Computer-assisted area detector masking. *J. Synchrotron Radiat.* 24 (Pt 2): 506–8, 2017. doi:10.1107/S1600577517000157
175. Borchers PH: Python: a language for computational physics. *Comput. Phys. Commun.* 177 (1-2): 199–201, 2007. doi:10.1016/j.cpc.2007.02.019
176. McIlhagga W: The Canny Edge Detector Revisited. *Int. J. Comput. Vis.* 91 (3): 251–61, 2011. doi:10.1007/s11263-010-0392-0
177. Chiu C, Clack N: Napari: A Python Multi-Dimensional Image Viewer Platform for the Research Community. *Microsc. Microanal.* 28 (S1), 1576–7, 2022. doi:10.1017/S1431927622006328
178. Caruso C, Quarta F: Interpolation methods comparison. *Comput. Math. Appl.* 35 (12): 109-26, 1988. doi:10.1016/S0898-1221(98)00101-1

179. Noolandi J, Hong KM: Theory of photogeneration and fluorescence quenching. *J. Chem. Phys.* 70 (7): 3230–6, 1979. doi:10.1063/1.437912
180. Eftink MR, Ghiron CA: Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.* 114 (2): 199–227, 1981. doi:10.1016/0003-2697(81)90474-7
181. Meaney MS, McGuffin VL: Investigation of common fluorophores for the detection of nitrated explosives by fluorescence quenching. *Anal. Chim. Acta* 610 (1): 57-67, 2008. doi:10.1016/j.aca.2008.01.016
182. Meyer B: Elemental sulfur. *Chem. Rev.* 76 (3): 367–88, 1976. doi:10.1021/cr60301a003
183. Green DG: The contrast sensitivity of the colour mechanisms of the human eye. *J. Physiol.* 196 (2): 415–29, 1968. doi:10.1113/jphysiol.1968.sp008515

7 Lebenslauf

Name: Steffen Manser
Geboren am: 22.05.1988
Geburtsort: Eberbach
Familienstand: Verheiratet

Beruflicher Werdegang:

08/2023 – heute Teamleiter Elektronikentwicklung bei Kübler Hallenheizungen GmbH, Ludwigshafen
Bereich: Forschung & Entwicklung nachhaltiger Heizungstechnik

01/2018 – 06/2023 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Hochschule Mannheim am Institut CeMOS (Center for Biomedical Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy), Mannheim
Bereich: optische Messtechnik und Automatisierung in der Medizintechnik

09/2016 – 09/2017 Werkstudent bei Sport Tiedje GmbH, Mannheim
Bereich: Kundenservice & Instandhaltung

10/2014 – 03/2015 Praktikant bei Daimler Buses | Evobus GmbH, Mannheim
Bereich: Product Engineering Testing and Powertrain / Reliability

03/2012 – 08/2012 Mechatroniker bei Neckar Drahtwerke GmbH, Eberbach
Bereich: Wartung und Inbetriebnahme von Industrieanlagen

Ausbildung:

10/2018 - heute Doktorand an der Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim

03/2016 – 09/2017 Hochschule Mannheim
Studiengang: Informationstechnik (Master)

-
- 22 September 2017 **Abschluss: Master of Science, M.Sc.**
Thesis: *Theoretische Analyse und Anwendung der induktiven Kurzfeldkopplung*
- 09/2012 – 01/2016 Hochschule Mannheim
Studiengang: Mechatronik (Bachelor)
- 27 Januar 2016 **Abschluss: Bachelor of Science, B.Sc.**
Thesis: *Entwicklung einer Elektronik für einen kontaktlosen phasenanalogen Wegsensor mit einem Schwingkreis geringer Güte*
- 09/1998 – 06/2007 Hohenstaufen-Gymnasium, Eberbach
Allgemeine Hochschulreife
- 22 Juni 2007 **Abschluss: Abitur**

Berufsausbildung:

- 09/2008 – 02/2012 Mechatroniker bei Fa. Neckar Drahtwerke GmbH, Eberbach
Berufsschule: Gewerbeschule Mosbach
- 29 Februar 2012 **Abschluss: Industrie-Mechatroniker (IHK)**

Publikationen:

Peer-Reviewed und Open Access:

- 2023 **Manser S***, Keck S*, Vitacolonna M, Wühler F, Rudolf R, Rädle M: Innovative Imaging Techniques: A Conceptual Exploration of Multi-Modal Raman Light Sheet Microscopy. *Micromachines* 14(9): 1739, 2023. doi:10.3390/mi14091739
- 2022 Schmitt L, Meyer C, Schorz S, **Manser S**, Scholl S, Rädle M: Use of a Scattered Light Sensor for Monitoring the Dispersed Surface in Crystallization. *Chemie Ingenieur Technik* 94(8): 1177-84, 2022. doi:10.1002/cite.202200076

- 2022 **Manser S**, Kommert S, Keck S, Spoor E, Rädle M: New Conceptual Study of a Highly Sensitive Photometric Raman Sensor. *Sensors* 22(16): 6098, 2022. doi:10.3390/s22166098
- 2019 Deuerling J, **Manser S**, Siber J, Keck S, Hufnagel T, Schmitt L, Medina I, Repke JU, Rädle M: Schnelle lokale Raman-Messung zur Untersuchung von Konzentrationsprofilen bei Mischvorgängen in Mikrokanälen. *Chemie Ingenieur Technik* 91(7): 1066-71, 2019. doi:10.1002/cite.201800105

* Die Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen

Non-Peer-Reviewed:

- 2021 Peschges KJ, **Manser S**, Starker A: Einfach, methodisch, erfolgreich: nachhaltig wirksame Strategien im Team. *Transfer – Das Online-Magazin des Steinbeis-Verbunds* Ausgabe 2, 2021
- 2020 Peschges KJ, **Manser S**, Starker A: *Im Team entwickeln – einfach, methodisch, erfolgreich*. 2. Aufl., Wiesbaden, Springer, 2020. doi:10.1007/978-3-658-31843-7
- 2019 Peschges KJ, **Manser S**: *Strömungsklausur im Nacken? Mit Methode locker packen*. 1. Aufl., Wiesbaden, Springer Vieweg, 2019. doi:10.1007/978-3-658-28146-5

Fachvorträge:

- 2021 Development of multimodal Raman Light Sheet Microscopy (mRLSM). 15. *Interdisziplinäres Doktorandenseminar des AK PAT*, 07. September 2021, virtuelle Konferenz.
- 2019 Development and testing of a voxel-based imaging method for three-dimensional tumor cell cultures using a combination of Raman and fluorescence spectroscopy. *Workshop: Interdisciplinary Perspective in Biomateriomics: Processing, Characterization & Application*, 20. Februar 2019, Reichenau.

8 Danksagung

Mit tiefster Dankbarkeit richte ich meinen ersten und herzlichsten Dank an meinen Doktorvater, Prof. Dr. Matthias Rädle. Die großzügige Gelegenheit, diese Dissertation zu verfassen, begleitet von anhaltender fachlicher Expertise und persönlicher Unterstützung, spielte eine entscheidende Rolle für ihren erfolgreichen Abschluss. Die bewilligten Fördermittel sowie die zur Verfügung gestellten Zeitressourcen haben diese Reise zusätzlich beflügelt.

Ein ebenso herzliches Dankeschön gilt Prof. Dr. Rüdiger Rudolf und Dr. Mario Vitacolonna von der Hochschule Mannheim sowie Dr. Johann Kern und Petra Prohaska vom UMM Mannheim. Ihre Mitwirkung reichte von der Bereitstellung entscheidenden biologischen Materials bis zur wertvollen fachlichen Unterstützung während der Datenauswertung.

Ein großer Dank gebührt ebenfalls meinen geschätzten Kolleginnen und Kollegen im CeMOS-Team, von denen einige eine besondere Hervorhebung verdienen. Allen voran möchte ich Herr Shaun Keck herausstellen, dessen kontinuierlich hervorragende Zusammenarbeit sowohl fachliche als auch zwischenmenschliche Facetten umfasste. Ebenfalls gebührt meine Anerkennung Frau Deborah Herdt und Herr Stefan Schorz, die mich nicht nur fachlich unterstützten, sondern auch durch tiefgründige Gespräche zur Seite standen. Ebenso möchte ich Björn van Marwick, Johann Strischakov, Pooja Kumari, Felix Wühler, Isabel Medina, Natalia Isinger, Natascha Heß-Mohr und Erik Spoor für ihre fachliche Expertise und ihre stets wertvollen Ratschläge würdigen.

Vor allem jedoch möchte ich meiner geliebten Ehefrau Sophie den allerhöchsten Dank aussprechen. Ihre bedingungslose Unterstützung und ihr starker Rückhalt ermöglichten es mir, die erforderliche Zeit für diese Promotion aufzubringen und mich auch durch herausfordernde Phasen zu führen. Ebenso möchte ich meiner gesamten Familie meinen aufrichtigen Dank aussprechen für ihr aufrichtiges Interesse und ihr bedingungsloses Engagement. Die Gewissheit, euch alle an meiner Seite in dieser entscheidenden Phase zu wissen, erfüllt mich mit tiefer Dankbarkeit.

Abschließend möchte ich meinen aufrichtigen Dank ausdrücken für die kostbare Zeit, die ich während meiner Promotion mit euch/Ihnen erleben durfte. Diese Erinnerungen werden für immer einen besonderen Platz in meinem Herzen einnehmen.